

Санкт-Петербургский Государственный университет

Биологический факультет

Кафедра зоологии беспозвоночных

Гафарова Елизавета Рустамовна

Анализ состава и изменчивости кишечной микробиоты в группе близких видов
литоральных моллюсков рода *Littorina*

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных

(зав. кафедрой – д.б.н. Гранович Андрей Игоревич)

Научный руководитель:

Старший преподаватель кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ, к.б.н.

Мальцева Арина Леонидовна.

Санкт-Петербург

2019

Содержание

Введение.....	3
Обзор литературы.....	6
Симбионты как часть экологической ниши позвоночных и беспозвоночных.....	6
Влияние кишечных симбионтов на метаболизм.....	7
Влияние кишечных симбионтов на эмбриональное и постнатальное развитие.....	10
Иммунные взаимодействия симбионтов с беспозвоночными хозяевами и защита от паразитов.....	11
Влияние кишечных симбионтов на поведение.....	12
Моллюски рода <i>Littorina</i> как модельный объект для эволюционных исследований.....	14
Материалы и методы.....	19
Результаты и обсуждение.....	27
Выводы.....	46
Благодарности.....	48
Список использованной литературы.....	49
Рисунки и приложения.....	57

Введение

Литораль – это гетерогенная среда, характеризующаяся как вертикальными (от нижней к верхней литорали изменяются влажность, волновое воздействие, время осушки и пр.), так и горизонтальными (например, соленость в эстуариях рек) градиентами изменения значений абиотических факторов. Каждая из зон литорали обладает своими особенностями экологии и характерным спектром микробиотопов. Гетерогенность такой среды может выступать в качестве предпосылки к экологически-опосредованной специализации и видообразованию. С этой точки зрения, все особенности экологической ниши, занимаемой определённой группировкой особей – комплекса биоценотических связей вида и факторов среды, включая не только пространственную компоненту, но и пищевые и иные отношения вида, – будут важны для понимания протекающих микроэволюционных процессов и всей эволюционной истории вида (Schluter 2009, Nosil 2012).

Моллюски рода *Littorina* – информативный модельный объект для эволюционных исследований. Эти гастроподы представлены комплексом криптических видов и экотипов, населяющих смежные в пространственном отношении и контрастных в экологическом отношении биотопах (Reid 1996, Galindo & Grahame 2014, Rolan-Alvarez et al. 2015). С одной стороны, среди моллюсков этого рода есть виды, с относительно недавней дивергенцией (~ 1 Мya; Reid, 2012), с другой – еще не дивергировавшие, но ясно специализированные субвидовые группы (экотипы; Boulding & Van Alstyne 1993, Johannesson et al. 1993, Hull et al. 1996, Reid 1996, Rolan-Alvarez & Johannesson 1997 и др.). В результате, группа предоставляет возможности для анализа ключевых эволюционных событий ad-hoc и post-hoc. Многие сравнительные аспекты морфологии, паразитологии, физиологии, репродуктивной биологии, транскриптомики и геномики данных видов детально охарактеризованы (Conde-Padín et al., 2009; Granovitch et al., 2009; Johannesson et al., 2010; Panova et al., 2011, 2014; Canbäck et al., 2012; Butlin et al., 2014; Ravinet et al., 2017 и др.). Однако детальная характеристика занимаемых экологических ниш, особенно, ее части, касающейся биоценотических связей, до сих пор имеет отрывочный, фрагментарный характер. Анализ комплекса микроорганизмов, с которыми разные виды и экотипы литторин, населяющие контрастные биотопы, формируют стабильные биоценотические взаимодействия – актуальная задача не только в области изучения литторин (регулярно проводимый с 1977 года Симпозиум по биологии и эволюции литторинид, ISOLBE, неизменно собирает более 100 исследователей со всего мира и вызывает живой интерес со стороны малакологических сообществ), но и с общебиологической точки зрения (поскольку

за последние 30 лет литторины стали востребованным модельным объектом для эволюционных исследований).

Наиболее подробно охарактеризовать состав микробиома (микроорганизмов, объединенных биоценоотическими связями) позволяют методы метабаркодинга, в частности, секвенирование переменных регионов генов малой субъединицы рибосомы с использованием технологии NGS. Применение указанного подхода открывает широкие возможности для исчерпывающих описаний про- и эукариотических сообществ на новом уровне (Valentini et al., 2016; Deiner et al., 2017 и др.).

В рамках комплексного проекта по реконструкции эволюционных процессов, протекающих или законченных в эволюционно недавнее время в популяциях моллюсков рода *Littorina*, подрод *Neritrema*, мы поставили целью:

используя метабаркодинг, качественно и количественно охарактеризовать биотическую компоненту экологических ниш нескольких видов литоральных моллюсков рода *Littorina*, в частности, сообщества эукариотических микроорганизмов, представляющих собой потенциальный пищевой субстрат и основу для кишечных сообществ, а также оценить влияние факторов "тип биотопа", "географический регион", "вид моллюска" на характеристики этих сообществ.

Для достижения этой цели был сформулирован ряд задач:

1. Произвести сбор моллюсков 3 видов литторин: *L. saxatilis* трех морфотипов (крабовая форма (C), верхняя (WH) и нижняя (WL) скальные формы, *L. fabalis*, *L. littorea* с последующей препаровкой средних и задних отделов кишечника, а также получить соскобы биопленок с поверхности четырех различных субстратов: верхняя и нижняя зоны прибойных скал, валуны и талломы *Fucus vesiculosus*) в двух точках на побережье Северного моря.
2. Амплифицировать фрагмент 18S-рДНК-гена и приготовить баркодированные библиотеки для секвенирования на платформе Illumina MiSeq для качественной и количественной оценки состава эукариотической компоненты сообществ (50 образцов).
3. Произвести биоинформатический анализ полученных данных секвенирования в пакете программного обеспечения Mothur (<https://www.mothur.org/>): сформировать операционные таксономические единицы (OTU), провести BLAST-анализ их таксономической принадлежности, описать состав сообществ микроскопических

организмов присутствующих в кишечнике моллюсков и на субстратах в различных типах биотопов.

4. Используя комплекс методов статистического анализа в программной среде R оценить влияние факторов "тип биотопа", "географический регион", "вид моллюска" на характеристики кишечных сообществ

Обзор литературы

Симбионты как часть экологической ниши позвоночных и беспозвоночных

Экологическая ниша – это весь комплекс биоценотических связей вида и диапазонов значений факторов среды, необходимый для его выживания и поддержания в природе, включая не только пространственную компоненту (местообитание), но и пищевые и иные отношения вида (Heams 2015). Ожидаемыми является множественность и разнообразие взаимодействий (как прямых – через непосредственный контакт, так и опосредованных – через метаболизирование микроорганизмами разнообразных субстратов) между многоклеточными организмами и про- и эукариотическими микроорганизмами, в результате которых последние оказываются вовлечены с разной степенью облигатности в формирование экологической ниши для многоклеточных. Часть этих взаимодействий имеет стабильный характер (и может быть квалифицирована как различные симбиозы). Особое значение среди них имеют «пищевые симбиозы», т.е. симбиотические взаимодействия топически связанные с пищеварительной системой многоклеточных животных. Эти взаимодействия влияют не только на особенности спектра питания животного, но также важны для многих других аспектов его физиологии (таких как иммунная компетентность, рост, половое созревание и плодовитость, и многие другие). Значимость таких «пищевых симбиозов» для функционирования животного организма нашла свое выражение в концепции «симбиотического органа» (см. O’Hara & Shanahan 2006). Хотя большинство исследователей уделяют внимание изучению прокариотических симбионтов, в понятие микробиоты входят не только бактерии, но и другие микроскопические организмы, многие из которых, например, инфузории или жгутиконосцы могут быть облигатными компонентами микробиоты (Oxford 1955, Poinar 2009, Amato 2016, Macke et al. 2017 и др.).

В пищеварительном тракте может присутствовать несколько категорий микроорганизмов: первичные симбионты, взаимодействие с которыми носит облигатный мутуалистический характер и которые вертикально наследуются от материнского организма; вторичные симбионты, аккумулированные из окружающей среды; пищевые объекты (Shapira 2016, Macke et al. 2017). Наличие факультативных микроорганизмов в данной системе и возможность комплекса микробиоты различаться среди популяций может отражаться на филогенезе организма хозяина (Douglas 2014, Amato 2016, Macke et al. 2017).

Bordenstein & Theis (2015) предлагают определять животных и растения не как автономные организмы, но как «голобионты», состоящие из хозяина и связанного с ним сообществом микробов, а совокупность их геномов как «гологеном». Такое видение живых объектов

позволяет воспринимать голобионтов (хозяина и связанные с ним микроорганизмы) как первичную единицу естественного отбора (Maske et al. 2017). Кишечный микробиом представляет собой обычно сложное, гетерогенное и изменчивое сообщество, которое собирается заново в каждом поколении хозяев различными путями (Shapira 2016, Maske et al. 2017).

Как указано выше, в составе кишечных сообществ могут присутствовать как пищевые объекты, так и разнообразные симбионты (факультативные или облигатные; позитивно, нейтрально или негативно влияющие на физиологию и репродуктивный успех хозяина). В силу своей значимости для общей приспособленности организма хозяина к среде, совокупность микроорганизмов, вступающих с ним в постоянный или временный контакт, представляет информативный объект для исследований экологии и эволюции вида хозяина. Далее будут рассмотрены несколько ярких примеров возможного влияния кишечных симбионтов на организм хозяина и механизмов такого влияния, как иллюстрация возможного «эволюционного веса» микробиома.

Влияние кишечных симбионтов на метаболизм

Кишечные микроорганизмы могут быть вовлечены в поддержание эффективного пищеварения, поставляя в организм хозяина витамины, незаменимые аминокислоты и другие метаболически важные соединения, ферменты, обеспечивающие инактивацию токсичных или биодоступность питательных веществ и пр. (Engel & Moran, 2013). Разрушение токсинов, обеспечение биодоступности и пр. со стороны бактерий и других микроорганизмов (жгутиконосцев, инфузорий и пр.) открывает возможность для выживания хозяина в той среде обитания, которая в противном случае была бы недоступна, т.е. модифицирует его экологическую нишу, что является эволюционно значимым событием (Engel & Moran 2013, Shapira 2016).

Пример 1: детоксикация. Экология питания травоядных млекопитающих сильно зависит от вторичных метаболитов, которые защищают растения от выедания. (Freeland & Janzen 1974) Исследование кишечной микробиоты пустынных хомяков *Neotoma lepida*, некоторые популяции которых специализируются на питании высокотоксичным кустарником *Larrea tridentata*, (Kohl et al. 2014) демонстрирует, что кишечные микробы имеют решающее значение в доступности токсичных растений для травоядных. Токсины В случае присутствия в пище токсинов *Larrea tridentata* в составе кишечного микробиома появляются линии микроорганизмов, вырабатывающие ферменты, которые разлагают токсичные соединения. Хомяки были неспособны потреблять ядовитый кустарник после принятия антибиотиков; переваривание токсинов животными, ранее не питавшимися на

L.tridentata, улучшалось за счет пересадки микробов от доноров, имевших опыт употребления этого растения в пищу. Авторами не выяснен механизм естественного приобретения микробиоты, задействованной в детоксикации, но предполагается ее аккумуляция из почвенных сообществ или непосредственно с поверхности растения. В данном случае микробы позволяют расширить диетический спектр млекопитающих-хозяев.

Среди беспозвоночных также встречаются специалисты в потреблении ядовитых субстратов. Кофейный жук *Hypothenemus hampei* является вредителем кофейных плантаций по всему миру, несмотря на кофеин – алкалоид, токсичный для насекомых. Seja-Navarro et al. (2015) показали, что кофеин может разлагаться в кишечнике *H.hampei* и что экспериментальная инактивация кишечной микробиоты устраняет такую возможность. Широко распространенные представители кишечной микробиоты, в том числе из рода *Pseudomonas* (Proteobacteria), используют кофеин как единственный источник углерода и азота и, выделяя кофеиндеметилазы для собственного пищеварения, разрушают токсичный для насекомого-хозяина алкалоид. Повторная инокуляция обработанных антибиотиками насекомых изолированным штаммом *Pseudomonas fulva* восстанавливает способность кофейных жуков к разложению кофеина, подтверждая ключевую роль этих бактерий. Примечательно, что основной состав кишечной микробиоты един для популяций *H.hampei* по всему миру, но отмечена вариабельная часть кишечного микробиома, не повторяющаяся среди групп жуков в отдельных странах, и метаболизм именно этих факультативных симбионтов связан с разложением кофеина и адаптации насекомого-хозяина к враждебной среде обитания.

Пример 2: предобработка пищевых субстратов. Бактерии, которые колонизируют кишечник млекопитающих (их разнообразие оценивается в более чем 500 линий (Qin et al. 2010, The Human Microbiome Project Consortium 2012)), в совокупности обладают гораздо большим набором ферментов и метаболических возможностей, чем их хозяева. Геномы млекопитающих не кодируют большинство ферментов, необходимых для разложения структурных полисахаридов, присутствующих в растительном материале. В частности, были обнаружены активные целлюлолитические виды бактерий в рубце парнокопытных (Morris & Gylswyk 1980). Основные группы таких разрушающих целлюлозу бактерий: грамположительные руминококки (Firmicutes) и грамотрицательные *Fibrobacter spp* (Fibrobacteres). Среди представителей рода *Ruminococcus* найдены кишечные бактерии, выделяющие во внеклеточное пространство ферментный комплекс функциональных белков (ксилаказы, ряд целлюлаз, в т. ч. GH48 экзоцеллюлаза), ответственный за переваривание целлюлозы. Бактерии рода *Fibrobacter* секретируют высокопроцессивные

целлюлазы (например, GH9). К числу не целлюлолитических относятся бактерии *Prevotella spp* (Bacteroidetes), некоторые виды которых участвуют в деацетилировании и деметилировании ксиланов и пектинов, а также разрушении эфирной связи между фенольными кислотами, что наряду с разрушением целлюлозы позволяет переваривать клеточные стенки. (Flint et al. 2012).

Пример 3: донорство метаболитов. Среди насекомых немало представителей, основная пища которых бедна питательными веществами и витаминами. Мухи цеце (*Glossina spp*), чья диета представлена кровью млекопитающих, находятся в облигатных симбиотических отношениях с бактериями *Wigglesworthia glossinidia*. Эти микроорганизмы в теле мух цеце формируют две популяции: внутриклеточную в особом отделе средней кишки – бактериоме – и внеклеточную в просвете молочной железы (Attardo et al. 2008). У мух цеце имеет место живорождение: взрослая самка производит одно яйцо за один репродуктивный цикл, которое развивается в выводковой камере матери. После созревания и линьки личинка третьего возраста выходит из материнского организма и окукливается во внешней среде. Питательные вещества и симбионты передаются потомству от матери в ходе вынашивания с секретом молочной железы. *W. glossinidia* участвуют в метаболизме, в частности, витаминов группы В; в их геноме присутствуют 62 гена, вовлеченных в биосинтез различных кофакторов и простетических групп (Akman et al. 2002, Weiss & Aksoy 2011).

Еще один пример кооперации наблюдается в системе гороховая тля *Acyrtosiphon pisum* / эндосимбиотическая бактерия *Buchnera aphidicola*. Питание флоэмным соком лишает гороховых тлей десяти незаменимых аминокислот, но содержащиеся в специализированных клетках (бактериоцитах бактериома) *Buchnera aphidicola* восполняют этот недостаток практически полностью, несмотря на то, что в геноме этих бактерий не хватает части ферментов аминокислотного биосинтеза (отсутствие ферментов компенсируется генными продуктами тлей); кроме того, в бактериоме могут перерабатываться вредные продукты азотистого обмена. Аминокислотный метаболизм в этой симбиотической системе представлен высоко интегрированной сетью с участием генных продуктов как насекомого-хозяина, так и его симбионта (Moya et al. 2008, Wilson et al. 2010, Hansen & Moran 2011). Исследование Hansen & Moran (2011) подтверждает несколько аспектов этой интеграции: комплиментарность геномов, кодирующих ферменты нескольких метаболических путей; взаимодополняемость путей биосинтеза заменимых и незаменимых аминокислот, кодируемых обоими геномами; аминотрансферазная активность, которая позволяет перерабатывать отходы аммиака для повышения запаса

аминокислот. В такой системе оба организма-участника не способны поддерживать метаболизм отдельно друг от друга, что служит ярким примером длительной коэволюции.

Аналогично, недостаток азота, получаемого с пищей термитами, может быть восполнен кишечными симбионтами. Расшифровка генома некультивируемого эндосимбионта из группы Bacteroidales, выделенного из целлюлолитического протиста *Pseudotrichonympha grassii* – симбионта кишечника термитов *Coptotermes formosanus*, объяснила способность этих бактерий фиксировать молекулярный азот и перерабатывать продукты азотистого обмена хозяина для биосинтеза различных аминокислот и кофакторов, а также импортировать глюкозу и ксилозу в качестве источников энергии и углерода. Переработка азотистых отходов мочевой кислоты 8 видов древесных термитов осуществляется разнообразными анаэробными бактериями, относящимися к Clostridia (Enterobacteriaceae) (Hongoh et al. 2008, Thong-On et al. 2012).

Влияние кишечных симбионтов на эмбриональное и постнатальное развитие

Кишечные бактерии способствуют росту и развитию как позвоночных, так и беспозвоночных хозяев либо косвенно (через их роль в обеспечении питательными веществами), либо непосредственным вмешательством в физиологию (например, предоставляя сигналы, стимулирующие процессы развития) (Engel & Moran 2013, Macke et al. 2017).

Микробиота воздействует на многие составляющие морфологии кишечника: архитектуру ворсинок, глубину крипт, пролиферацию стволовых клеток, интенсивность васкуляризации, свойства и толщину слизистого слоя, созревание лимфоидных тканей, ассоциированных со слизистыми оболочками. У мышей, лишенных бактерий, ворсинки в дистальном отделе кишечника длиннее и тоньше и пронизаны менее сложной сосудистой сетью, чем ворсинки животных с нормальным набором микробов. В отсутствие бактерий кишечные крипты менее глубоки и содержат меньше пролиферирующих стволовых клеток. Кроме того, для аксенных животных отмечено уменьшение толщины слизистого слоя и изменение свойств слизи. У мышей, обработанных антибиотиками, мало одиночных лимфоидных фолликулов, Пейеровы бляшки и брыжеечные лимфатические узлы развиты недостаточно. В условиях отсутствия микробов уровни иммуноглобулина А (IgA) и антимикробных пептидов ниже, чем у здоровых животных (Sommer & Bäckhed 2013). Действительно, колонизация безмикробных мышей одним видом, *Bacteroides thetaiotaomicron*, влияет на экспрессию различных генов хозяина, которые влияют на усвоение питательных веществ, обмен веществ, ангиогенез, барьерную функцию слизистой оболочки функция и развитие кишечного отдела нервной системы. Благодаря синтезу

короткоцепочечных жирных кислот, резидентные бактерии положительно влияют на дифференцировку и пролиферацию кишечных эпителиальных клеток. Сложная сеть совместной метаболической активности организма-хозяина и кишечных симбионтов интенсифицирует усвоение питательных веществ: по сравнению с мышами, колонизированными бактериями, свободные от бактерий животные нуждаются в более калорийной пище для поддержания нормальной массы тела, таким образом кишечные бактерии являются модуляторами развития жировых тканей хозяина (O'Hara & Shanahan 2006).

Мухи цеце страдают от иммунной недостаточности, лишившись облигатного симбионта – бактерии рода *Wigglesworthia*. Выше упоминалось, что в организме взрослой мухи обязательно присутствуют две разные популяции *Wigglesworthia* (внутриклеточная в области средней кишки и внеклеточная в молочной железе), и при размножении этот симбионт вертикально переносится в организмы потомков. Обработка «беременных» мух ампициллином приводит к уничтожению внеклеточной популяции, оставляя связанные с бактериомом клетки *Wigglesworthia* нетронутыми. Таким образом, потомство обработанных ампициллином самок (*GmmWgm*⁻) лишается *Wigglesworthia*. У взрослых *GmmWgm*⁻ проявляется иммунодефицитный фенотип по сравнению с мухами дикого типа (заражение *GmmWgm*⁻ индивидов кишечной палочкой приводит к бактериальному сепсису и смерти, тогда как дикий тип успешно справляется с такой инфекцией). (Weiss & Aksoy 2011). У дрозофилы кишечная микробиота способствует пролиферации стволовых клеток и обновлению эпителия средней кишки, в том числе, для защиты от бактериальных инфекций (Macke et al. 2017).

Иммунные взаимодействия симбионтов с беспозвоночными хозяевами и защита от паразитов

Одна из возможных функций микробиоты – защита кишечника от колонизации экзогенными патогенами с помощью нескольких механизмов, которые включают прямую конкуренцию за ограниченные питательные вещества и модуляцию иммунных ответов хозяина. Разрушение нормального микробного сообщества повышает риск возникновения патогенной инфекции, чрезмерного роста вредных патобионтов и воспалительных заболеваний (Kamada et al. 2013).

Довольно сложная схема анитипаразитарной защиты реализована факультативными эндосимбионтами *Hamiltonella defensa* в организме тлей: эти бактерии могут обеспечить выживание хозяев после атаки наездниками. Разные штаммы *H.defensa* различаются по степени толерантности к атаке паразитоидами, которой они наделяют тлей, убивая

развивающихся личинок ос. Симбионт-опосредованный защитный фенотип зависит от наличия лизогенного бактериофага (APSE), присутствующего в некоторых штаммах симбионта. Этот кодирующий токсичные для ос вещества вирус растений распространяется тлей при питании, и *Hamiltonella defensa* обеспечивают его защиту при передаче, выделяя специальный белок симбионин (Oliver et al. 2006, Hogenhout et al. 2008, Degnan et al. 2009, Hansen & Moran 2011). Организмы тлей, колонизированные *H.defensa*, инфицированной APSE, значительно более устойчивы в отношении паразитоидных ос, чем тли, в которых встречаются только неинфицированные APSE симбионты. В лабораторных исследованиях многократно отслеживалась потеря фагов организмами *H.defensa*-инфицированных тлей, и в каждом случае это явление приводило к повышенной восприимчивости хозяина к паразиту. APSE-опосредованная защита реализуется за счет экспрессии генов токсинов бактериофага (Degnan & Moran 2008, Weiss & Aksoy 2011). Интересно также отметить, что вид хозяина полностью утратил многие гены противобактериальной защиты; считается, что возможным фактором, определившим такую «иммунологическую редукцию» в эволюции генома хозяина, явилась необходимость поддержания симбиотических отношений с первичными и вторичными симбионтами (Gerardo et al. 2010, Laughton et al. 2011). Данная система представляет пример того, как (1) сложный союз нескольких видов (макро- и микроорганизмов) может стабильно поддерживаться в биоценозе в определённых условиях, и служить эффективным механизмом адаптации для выживания в конкретном сообществе и интеграции вида в сообщество; и (2) симбиотические отношения влияют на эволюционную историю вида и особенности его генома.

Влияние кишечных симбионтов на поведение

Социальные взаимодействия могут влиять на таксономический и генетический состав микробиома животных, что потенциально имеет последствия, отраженные в изменении функции микробиома для жизни хозяина, в то же время микробиом может влиять на социальное поведение животных, производя химические сигналы, используемые в социальной коммуникации и непосредственно воздействуя на нервную систему хозяина. Таким образом, микробиом обещает пролить новый свет на эволюцию социального поведения животных и стратегии трансмиссии микробов (Archie & Tung 2015).

В ряде случаев показаны сложные воздействия со стороны микросимбионтов на функционирование нервной системы позвоночных (Foster et al. 2013, Hsiao et al. 2013, Desbonnet et al. 2014, Cryan and Dinan 2015, etc.). Аксенные мыши обладают серьезными изменениями в работе мозга, в том числе поведенческими девиациями, выраженными в повышенной тревожности и аутистических чертах (дефицит общительности, социального

познания и регулярное повторение действий) (Archie & Tung 2015). Недавнее исследование (Valles-Colomer et al. 2019) выявило отрицательную корреляцию присутствия кишечных бактерий *Faecalibacterium*, *Dialister* и *Coprococcus* с развитием депрессии у человека. Наличие этих бактерий в дистальных отделах ЖКТ воспроизводимо ассоциировано с высокими показателями качества жизни, что авторы связывают с бактериальным синтезом дофамина предшественника, 3,4-дигидрофенилуксусной кислоты (DOPAC), и γ -аминомасляной кислоты (ГАМК, GABA). Конкретные пути воздействия микробиотических метаболитов на ЦНС человека, однако, не установлены.

Экологическое расхождение популяций животных-хозяев сопровождается изменениями в их бактериальных сообществах, которые могут определять половые предпочтения разошедшихся групп. Кишечные бактериальные сообщества различных популяций плодовой мухи *Drosophila melanogaster* воздействуют на качественный состав кутикулярных углеводов (СНС), которые используются насекомыми как половые феромоны. Было показано, что мухи предпочитают спариваться с особями, представляющими аналогичные СНС и, следовательно, похожие кишечные бактериальные сообщества, состав которых напрямую определяется диетой. Кишечная флора, в частности, *Lactobacillus plantarum*, может воздействовать на гены животных, которые кодируют половые феромоны (Sharon et al. 2010, Lizé et al. 2013) или самостоятельно выделять специфические молекулы, действующие как половые аттрактанты, например, в случае новозеландского скарабея *Costelytra zealandica* (Hoyt et al. 1971, Shapira 2016).

Все описанные типы влияния микробиоты на жизнедеятельность хозяев так или иначе опосредуют возможность последних занимать определенную экологическую нишу. Способностью облегчать адаптацию хозяев к среде обладают не только организмы, постоянно находящиеся в теле хозяина, но и микробы, контакт с которыми непродолжителен и не обязателен. Примечательно, что именно полученные с пищей бактерии могут оказывать определяющее воздействие на распространение генов отдельной особи или популяции. Таким образом, при описании симбиотических взаимоотношений с микроскопическими организмами требуется характеризовать все разнообразие микробиоты, с которой контактируют многоклеточные в ходе онтогенеза.

Моллюски рода *Littorina* как модельный объект для эволюционных исследований

Литоральные гастроподы широко распространенного рода *Littorina* представлены на европейских побережьях морей Северной Атлантики 6-ю видами: филогенетически близкими *L. saxatilis*, *L. arcana*, *L. compressa*, *L. obtusata*, *L. fabalis* из подрода *Neritrema* и *L. littorea* из подрода *Littorina*.

Подрод *Neritrema* разделяют на 2 группы криптических видов – группу “*saxatilis*”, которая включает *L. compressa*, *L. arcana* и *L. saxatilis* и группу “*obtusata*”, к которой относятся виды *L. obtusata* и *L. fabalis* (Reid, 1996). Между ними существуют различия в конхиологических характеристиках, однако, точное видовое определение базируется на анатомических признаках половой системы (Ганжа и др. 2006, Старунова и др. 2010, Reid 1996, Granovitch et al. 2004, Granovitch et al. 2008). С экологической точки зрения, виды группы “*obtusata*” тяготеют на литорали к зоне фукоидов; причем *L. fabalis* предпочитает держаться на *Fucus serratus* (в нижней части литорали и верхней сублиторали), тогда как *L. obtusata* – на *F. vesiculosus* и *Ascophyllum nodosum*, в нижней и средней литорали (Яценко & Гранович 2002, Watson & Norton 1987, Williams 1990, Reid 1996, Granovitch et al. 2013); однако это разделение не является абсолютным и зоны распространения двух видов частично перекрываются. Виды *L. arcana* и *L. saxatilis* из группы “*saxatilis*” предпочитают держаться на каменистой части литорали (разных размерных фракций от мелкой гальки до крупных валунов и скальных поверхностей), причем *L. arcana* преимущественно в верхней зоне литорали, а *L. saxatilis* по всей литоральной зоне от верхних до нижних горизонтов. *L. compressa* преимущественно встречается в зоне фукоидов в нижней части литорали (Graham & Mill 1986, Granovitch et al. 2004, Granovitch et al. 2013).

Вид *L. saxatilis* характеризуется наиболее обширным географическим ареалом среди других представителей *Neritrema* (Reid 1996); кроме того, этот вид, как указано выше, населяет наиболее обширную часть литоральной зоны. Для *L. saxatilis* показан высокий уровень полиморфизма по различным признакам (окраска раковины, форма раковины, объем мантийной полости, степень развития ноги и пр.) в связи как с географией распространения, так и положением на литорали; более того, показано многократное и независимое формирование комплексов адаптивных признаков в стереотипных условиях обитания, см. рис. 1. (Grahame et al. 1986, Johannesson 1986, Boulding & Van Alstyne 1993, Johannesson et al. 1993, Hull et al. 1996, Reid 1996, Rolan-Alvarez & Johannesson 1997, Galindo & Grahame 2014).



Рис. 1. Экотипы *L. saxatilis*, населяющие контрастные биотопы (открытый волновому воздействию, Wave; или же затишный, но сопряженный с возможностью атак на моллюсков со стороны хищных крабов, Crab) на побережьях Галиции (Spain), Британских островов (Britain) и Швеции (Sweden). «Волновой» экотип характеризуется меньшими размерами, тонкой раковиной с менее выраженным завитком и широким устьем. Для «крабового» экотипа, наоборот, свойственны относительно большие размеры, толстостенная раковина с ребрами жесткости, хорошо выраженным завитком и узким устьем. (из Butlin et al. 2014).

На побережье Галиции (Испания) обитают 2 экотипа *L. saxatilis*: крупные особи с ребристой раковиной и маленькой апертурой (RB, ridged-banded), населяющие верхнюю часть литоральной зоны; и более мелкие моллюски с гладкой раковиной и большой апертурой (SU, smooth-unbanded), встречающиеся в нижней литорали. Ключевым фактором, определяющим формирование соответствующего адаптивного комплекса в верхней части литорали, выступает хищничество мраморного краба (*Pachygrapsus marmoratus*), длительные периоды осушения и солнечной экспозиции (мощная раковина защищает взрослых особей от поедания крабами; узкое устье, во-первых, уменьшает площадь контакта с разогретым солнечным излучением субстратом во время отлива и, во-вторых, снижает потерю влаги при закрывании раковины оперкулумом в ходе осушки). В условиях нижней литорали такую «формообразующую» функцию выполняет волновое воздействие (широкое устье, малые размеры и «коренастая» форма раковины позволяют противостоять действию волн и избежать потери контакта с субстратом; крабы отсутствуют в этой зоне литорали, поскольку смываются волнами) (Butlin et al. 2014, Galindo & Grahame 2014, Rolan-Alvarez et al. 2015).

Аналогичная пара экотипов встречается на побережьях Британских островов. В верхней зоне (представленной отвесными скалами или крупными валунами) обитают литторины с

большой апертурой и тонкой раковиной (Н, high shore), в нижней зоне (покрытая фукоидами, обрастающими галечный субстрат) – с толстой раковиной и маленькой апертурой (М – mid-shore) (Hull & Grahame 1996).

Наконец, на побережье Швеции «волновой» и «крабовый» экотипы разнесены не вдоль вертикального градиента литорали, а горизонтально – в соответствии с различными условиями вдоль побережья. Экотип Е (Е = W – exposed = wave) с тонкой раковиной (поскольку не подвергается атакам со стороны крабов) обитает на открытых скальных поверхностях; моллюски верхних и нижних зон скал морфологически различаются: у «нижних» форм (WL – wave lower) более широкое устье и низкая раковина (для плотного присасывания к поверхности скалы), у «верхних» форм (WH – wave higher) более узкое устье и высокая узкая раковина (моллюски могут принимать вертикальное положение во время отлива, открепляясь от разогретой солнцем поверхности, рис. 2.; узкое устье способствует уменьшению десикации). Экотип S (S = C – sheltered = crab) живет в затишных бухтах на заросшей фукоидами литорали, где встречается с хищным крабом *Carcinus maenas*; крабы употребляют моллюсков в пищу (в основном, молодых), раздавливая раковину клешнями (Rolan-Alvarez & Johannesson 1997).



Рис. 2. Особь *L. saxatilis*, на скалистой поверхности в солнечный день: моллюск открепляется от субстрата для уменьшения разогрева и закрывает оперкулюмом раковину для предотвращения потери влаги. Побережье Северного моря, Швеция. Фото А.Л.Мальцевой.

Формирование экотипов моллюсками *L. saxatilis* рассматривается как модельный процесс ранних этапов эволюции путем симпатрического экологического видообразования (Butlin et al. 2014, Galindo & Grahame 2014, Rolan-Alvarez et al. 2015). Многократность и

независимость формирования экотипов в естественных градиентах экологических факторов была продемонстрирована как на иберийских, так и шведских популяциях. Спецификация экотипов может происходить на различной генетической основе (т.е. под позитивным отбором оказываются разные участки генома – так называемые outliers) и протекать даже при сохранении потока генов между дивергирующими группировками (Butlin et al. 2014, Westram et al. 2014, Ravinet et al. 2016). Определяющей движущей силой этого процесса выступает экологическая (а в ряду поколений – эволюционная) адаптация к особенностям населяемого микробиотопа. Однако, не смотря на общебиологическую значимость рассматриваемого процесса, сами микробиотопы, адаптация к которым может вовлекать разные наборы генов в разных популяциях, охарактеризованы достаточно бедно: кроме таких общих характеристик как длительность осушки, максимальная температура субстрата, волновое воздействие и присутствие хищных ракообразных, о них мало что известно.

Вполне ожидаемым является отличия в наборе биоценотических партнеров (т.е. видов, с которыми устанавливаются стабильные биоценотические связи) в разных типах биотопов. Хищные крабы, поддерживающие давление отбора при формировании «крабового» экотипа, являются ярким тому подтверждением, однако, очевидно не исчерпывают всего спектра ключевых видов, взаимодействия с которыми определяют специфику занимаемой моллюсками конкретного экотипа экологической ниши в конкретном биотопе. Среди таких видов могут быть паразитические организмы, в том числе, трематоды, грегарины и инфузории (Kofoid 1903, Koura et al. 1990, Granovitch & Mikhailova 2004, Wojko et al. 2017). Из почти двух десятков видов трематод, паразитирующих в литторинах (см. Гранович 2016), большинство попадает в организм моллюсков пассивно при проглатывании с пищевым субстратом. При этом спектры питания литторин разных видов и разных экотипов, которые, несомненно, влияют на физиологические особенности моллюсков, охарактеризованы недостаточно полно.

Некоторый объем информации представлен в доступной литературе относительно спектра пищевых субстратов моллюсков *L. littorea*, *L. obtusata* и *L. fabalis*; все эти виды обозначаются как растительноядные микрососкребатели (micrograzers). Однако, предпочитаемые пищевые объекты разнятся. *L. littorea* предпочитает держаться среди валунов и камней (почему ее обозначают как rocky-dweller), и хотя ее присутствие оказывает сильное влияние на биомассу различных водорослей, в том числе, фукодов (Trussell et al. 2002). В качестве предпочитаемого пищевого субстрата она выбирает водоросли родов *Ulva* и *Enteromorpha* (Lubchenco 1980, Watson & Norton 1985), но в целом

отличается широким спектром возможных пищевых объектов, далеко выходящим за пределы бурых и зеленых водорослей (McQuaid 1996). Моллюски *L. obtusata* и *L. fabalis*, напротив, преимущественно держатся в зоне фукоидов, чаще всего на их поверхности и характеризуются как пищевые специалисты (Watson & Norton 1987, Long et al. 2007). Оба вида предпочитают генеративные рецептакулы на талломах водорослей вегетативным частями таллома; среди наиболее охотно потребляемых пищевых объектов *L. obtusata* были описаны молодые проростки *F. vesiculosus*, тогда как для *L. fabalis* – *F. serratus*. Именно в связи с этими видами фукоидов данные два вида регистрируются в природных популяциях, соответственно. Авторы также отмечают существенные различия в строении зубов радулы данных двух близких видов литторин, что, вероятно, сказывается на выборе ими пищевого объекта. *Ascophyllum nodosum*, на котором встречаются представители обоих видов, был среди редко выбираемых пищевых объектов как со стороны *L. obtusata*, так и *L. fabalis*, особенно если был в комбинации с нитчатой красной водорослью *Polysiphonia lanosa*, которая часто обрастает его талломы в природных условиях. Среди избегаемых видов была описана нитчатка *Cladophora rupestris*, Ulvophyceae, Chlorophyta (Watson & Norton 1987).

Представители видов группы “saxatilis” значительно менее исследованы в этом отношении. О пищевых предпочтениях *L. arcana* и *L. compressa* нет доступной информации. *L. saxatilis* в нескольких статьях упоминается как растительноядный вид (наравне с *L. obtusata* и *L. littorea*). По своему паттерну данный вид более напоминает *L. littorea*, поскольку отдает явное предпочтение зеленой нитчатке рода *Enteromorpha* в сравнении с бурыми водорослями (например, *Pilayella littoralis*); однако, в отличие от *L. littorea*, данный вид потребляет только молодые проростки водоросли, полностью игнорируя талломы взрослых особей (Lotze & Worm 2000). Также считается, что литторины группы видов “saxatilis” могут использовать бактериальный биопленки с поверхности камней и водорослей в качестве пищевого объекта (Reid 1996).

Таким образом, есть все основания полагать, что расщепление экологических ниш могло играть важную роль в обособлении видов молодых литторин (по крайней мере некоторых, например, пар *L. fabalis* / *L. obtusata* или *L. saxatilis* / *L. compressa*, поскольку они будучи филогенетически очень близки, существенно различаются в экологических и физиологических характеристиках), а также экотипов *L. saxatilis*. Однако сами экологические ниши этих видов охарактеризованы слабо, особенно, с точки зрения спектра биоценотических связей, формируемых с другими участниками сообществ, в первую очередь, находящихся на низ-лежащих ступенях пищевых цепей (компоненты выше-лежащих уровней, например, паразиты – достаточно детально описаны).

Материалы и методы

Сбор материала

Для характеристики состава и вариабельности микробиома были собраны моллюски 3 видов литторин *L. saxatilis* трех морфотипов (крабовая форма (C), верхняя (WH) и нижняя (WL) скальные формы (Johannesson et al. 1995, Johannesson and Tatarenkov 1997), *L. fabalis* (оба вида принадлежат подроду *Neritrema*), а также *L. littorea* (подрод *Littorina*), и средовые образцы (соскобы с поверхности четырех различных субстратов: верхняя и нижняя зоны прибойных скал, валуны и талломы *Fucus vesiculosus*) в двух точках (остров Ramsö 58°49'52.6"N 11°04'00.8"E и остров Arsholmen 58°49'58.1"N 11°08'03.5"E) на побережье Северного моря вблизи морской исследовательской станции Tjärnö кафедры морских наук Гетеборгского университета, Швеция (схема расположения разных *Littorina* на литорали представлена в Приложении 1.). Сбор был произведен 30 июля 2018. В каждом случае моллюсков собирали с ограниченного сектора литорали: скала шириной 8-10 метров, общая протяженность вдоль вертикального градиента литорали 20-25 метров, верхние и нижние скальные формы *L. saxatilis* были разнесены не менее чем на 15 м (нижние формы собирали по урезу воды во время отлива); затишная часть берега шириной ~15 метров и протяженностью вдоль вертикального градиента литорали ~10 метров, все моллюски затишной зоны были собраны в нижней части литорали (не выше 5 метров от уреза воды) с камней и фукусов (крабовая форма *L. saxatilis*, *L. fabalis*, *L. littorea*); все моллюски, собранные в одной зоне одной из точек сбора, были объединены (чтобы нивелировать эффект локальной агрегации); при получении средовых образцов объединяли материал от многих (10-25) независимых соскобов в пределах выбранной зоны литорали (чтобы нивелировать микробиотопические различия в пределах анализируемой зоны литорали). Кроме того, 03 августа 2018 были отобраны моллюски *L. saxatilis* (третье поколение, содержащееся в аквариуме) и соскобы биопленок из двух изолированных аквариальных систем (8FE-1, 9FE-7) морской станции. Также был приготовлен образец для негативного лабораторного контроля (соскоб с пустых чашек Петри, в которых вскрывали моллюсков).

Соскребаемые биопленки (Швеция) были помещены в пробирки со спиртом (этанол, 70%) непосредственно во время отбора образцов на литорали. Собранные моллюски были отпрепарированы на следующий день после сбора в лаборатории: после нарушения целостности раковины и извлечения мягких тканей тела моллюска материал средней и задней кишки изолировали от прилежащих тканей и помещали вместе с содержимым в пробирки с 70% этанолом. В одной пробирке объединяли материал кишечника 5-и случайно

выбранных особей определенного вида или морфотипа (без учета пола);, для каждого образца сравнения был приготовлено 3 биологические повторности в отдельных пробирках (т.е. суммарно анализировали кишечный материал от 15 индивидуумов в каждой из 10 групп сравнения, по 5 групп сравнения в каждой точке сбора). Моллюски, зараженные трематодами, не были использованы для анализа.

Лабораторная обработка

Выделение ДНК из спиртовых фиксаций было произведено с использованием набора DNeasy PowerSoil (QIAGEN, ID: 12888-100) по протоколу, рекомендованному производителем (<https://www.qiagen.com/br/resources/download.aspx?id=5a0517a7-711d-4085-8a28-2bb25fab828a&lang=en>).

Дальнейшая работа включала процесс подготовки 18S-рДНК-библиотек с двойным индексированием для секвенирования на платформе Illumina MiSeq. Подготовка включала следующие этапы: внутренняя ПЦР, очистка № 1, внешняя ПЦР, очистка № 2 и финальное эквимоллярное объединение ПЦР-продуктов разных образцов. Концентрация ДНК в образцах по завершении каждого этапа была измерена с помощью флуориметра Qubit 2.0 (ThermoFisher Scientific, кат. № Q32866) и набора Qubit™ dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, Invitrogen, кат. № Q32853).

Внутренняя ПЦР

В качестве основы для проведения ПЦР была использована смесь KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems), для стабилизации ферментов при подготовке к амплификации применен бычий сывороточный альбумин, BSA (New England BioLabs).

Прямой и обратный праймеры включали последовательности адаптеров праймеров внешней ПЦР.

Структура праймеров для внутренней полимеразной цепной реакции (https://github.com/EnvGen/LabProtocols/blob/master/Amplicon_dual_index_prep_EnvGen.rst):

(5'–ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT – fwd_primer – 3')

(5'–AGACGTGTGCTCTTCCGATCT – rev_primer – 3')

Для амплификации фрагментов гена 18S-рДНК были использованы праймеры, оптимальные для исследований с применением секвенирования нового поколения (Wang et al. 2014):

EUK1181 (5'-TTAATTTGACTCAACRCGGG-3')

EUK1624 (5'-CGG GCGGTGTGTACAAAGG-3').

Для подавления амплификации фрагмента 18S из генома *L. saxatilis* мы использовали рекомендованную Vestheim & Jarman, 2008 блокирующую последовательность с C3-модификацией на 3' конце (5' - GTGTACAAAGGGCAGGGACG-C3 - 3'), которая добавлялась в смесь внутренней ПЦР. Дизайн блокирующей последовательности разработан на основе известной последовательности 18S-рДНК *L. saxatilis* (NCBI, Gene Bank ID Y1175.1.). Используемая блокировка не дает абсолютного подавления амплификации ДНК хозяина (литторин), поэтому амплифицированные участки ДНК моллюсков были дополнительно отфильтрованы на начальных этапах биоинформатического анализа.

Протокол ПЦР-смеси для одной реакции:

Смесь КАРА	10 µl
Прямой праймер (внутренняя ПЦР), концентрация праймера 10 µM	1 µl
Обратный праймер (внутренняя ПЦР), концентрация праймера 10 µM	1 µl
Вода	3 µl
BSA, концентрация 20 mg/ml	0,5 µl
ДНК, концентрация 1 ng/µl	5 µl

Метод амплификации:

Этап	t°C	продолжительность
Начальная денатурация	98°C	2 мин
Денатурация в цикле	98°C	20 сек
Отжиг праймеров	54°C	20 сек
Элонгация в цикле	72°C	15 сек
Финальная элонгация	72°C	2 мин

Этапы 2-4 составляют цикл. Метод включал 25 циклов.

Очистка № 1

Стадия очистки была выполнена для удаления неиспользованных праймеров, возможных димеров праймеров, нуклеотидов или низкомолекулярных неспецифических продуктов и других примесей. Очистку ампликонов производили с использованием магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, кат. № A63881) и магнитного штатива согласно протоколу подготовки библиотек для метагеномного секвенирования Illumina (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf, PCR Clean-UP, p.8).

Внешняя ПЦР

Цель данного этапа - включение двух баркодов в состав очищенных ампликонов, которые также содержат участки для прикрепления фрагментов ДНК с баркодом к поверхности ячеек Illumina во время секвенирования.

Структура праймеров для баркодирования в ходе внешней ПЦР (https://github.com/EnvGen/LabProtocols/blob/master/Amplicon_dual_index_prep_EnvGen.rst):

Прямой индексирующий праймер: (5' – AATGATACGGCGACCACCGAGA{TCTACAC} – [index1] – ACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT – 3')

Обратный индексирующий праймер: (5' – CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT – [index2] – GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT – 3').

Протокол ПЦР-смеси для одной реакции:

Смесь КАРА	14 µl
Прямой баркодированный праймер (внешняя ПЦР), концентрация праймера 10 µM	1 µl
Обратный баркодированный праймер (внешняя ПЦР), концентрация праймера 10 µM	1 µl
Очищенный продукт внутренней ПЦР, концентрация не больше 2,4 ng/µl	12 µl

Метод амплификации:

Этап	t°C	продолжительность
Начальная денатурация	98°C	2 мин
Денатурация в цикле	98°C	20 сек
Отжиг праймеров	62°C	30 сек
Элонгация в цикле	72°C	30 сек
Финальная элонгация	72°C	2 мин

Этапы 2-4 составляют цикл. Метод включал 8 циклов.

Очистка № 2

Очистку ампликонов производили как описано выше (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf, PCR Clean-UP 2, p.13).

Финальное пулирование

Данный этап заключался в объединении амплифицированной ДНК всех образцов в эквимольном количестве для секвенирования (100 ng ДНК из каждой пробы).

Секвенирование на платформе Illumina MiSeq

Все баркодированные образцы с индивидуальными индексами были просеквенированы с использованием технологии NGS на платформе Illumina MiSeq сотрудниками Национальной геномной инфраструктуры (NGI) в Швеции (<https://ngisweden.scilifelab.se>).

Обработка данных и биоинформатический анализ

Распределение прочтений по группам сравнения согласно баркодам было выполнено специалистами Национальной геномной инфраструктуры (NGI). Качество полученных последовательностей оценивалось с помощью программы FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), нуклеотиды с ожидаемо низким качеством прочтения и последовательности адаптеров (около 20 нуклеотидов на концах прочтений) удалены в ходе триммирования по алгоритму *cutadapt* (Martin 2011). Первичная фильтрация прочтений проходила в пакете программного обеспечения *mothur* MiSeq SOP (https://mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) и включала исправление ошибок секвенирования с использованием обратных прочтений; удаление прочтений короче и длиннее ожидаемого фрагмента (443 нуклеотида); объединение дубликатов; выравнивание прочтений согласно референсным последовательностям базы данных *silva* (<https://www.arb-silva.de/>); удаление последовательностей с гомополимерными участками длиной более 8 нуклеотидов; предварительную кластеризацию фрагментов, не более чем с 1 различием на каждые 100 п.н.; удаление химерных последовательностей, а также случайно амплифицированных фрагментов геномов, определяемых как относящихся к митохондриям, хлоропластам, прокариотам, моллюскам рода *Littorina* и *Fucus vesiculosus*. Биоинформатический анализ был продолжен формированием OTU также в пакете *mothur*. Согласно sequence-based протоколу были сформированы операционные таксономические единицы (OTU), т.е. прочтения были сгруппированы в OTU на основании сходства (отличия не более 3%), далее был проведен BLAST-анализ их таксономической принадлежности с использованием базы данных *silva*. Последовательности, количество прочтений которых выявлялось на уровне таковых в негативном контроле, были исключены из анализа.

Статистическая обработка и визуализация

Анализ таблиц OTU был произведен в среде языка R (R v.3.5.3; The R Foundation for Statistical Computing). Предобработка данных включала удаление OTU с числом прочтений меньше 100 (лабораторный фон); OTU, встреченных 1 раз во всем наборе данных; OTU, присутствующих менее чем в 5% проб. Для сравнительного анализа число прочтений всех OTU было нормализовано по медианному размеру библиотеки. Подготовка данных была проведена при помощи пакета *phyloseq* (McMurdie and Holmes 2013). В результате, в анализ вошло 50 образцов и 53 таксономические единицы (см. Таблица 1).

Таблица 1. Распределение 50-и образцов по биотопам и точкам сбора.

Arsholmen			
	Каменистая литораль	Нижняя зона скал	Верхняя зона скал
кншка	<ul style="list-style-type: none"> • L. fabalis (x3) • L. littorea(x3) • L. saxatilis C (x3) 	<ul style="list-style-type: none"> • L. saxatilis WL (x3) 	<ul style="list-style-type: none"> • L. saxatilis WH (x3)
среда	<ul style="list-style-type: none"> • biofilms (x3) • F. vesiculosus (x1) 	<ul style="list-style-type: none"> • biofilms (x3) 	<ul style="list-style-type: none"> • biofilms (x3)
Ramsö			
	Каменистая литораль	Нижняя зона скал	Верхняя зона скал
кншка	<ul style="list-style-type: none"> • L. fabalis (x3) • L. littorea(x3) • L. saxatilis C (x3) 	<ul style="list-style-type: none"> • L. saxatilis WL (x3) 	<ul style="list-style-type: none"> • L. saxatilis WH (x3)
среда	<ul style="list-style-type: none"> • biofilms (x3) • F. vesiculosus (x1) 	<ul style="list-style-type: none"> • biofilms (x3) 	<ul style="list-style-type: none"> • biofilms (x3)

Биологическое разнообразие микробиоты охарактеризовали на уровне альфа- и бета-разнообразия. Альфа разнообразие — это характеристика богатства внутри отдельных сообществ (Whittaker 1970). Для описания альфа-разнообразия оценивали таксономическое богатство, характеризуя число OTU в пробах. Кроме этого, использовали индекс разнообразия Шеннона ($H = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$, где p_i — доля особей определенного вида ($p_i = n_i/N$)), который учитывает численность таксонов и их соотношение: чем больше в сообществе видов и чем меньше отличается их численность, тем выше значение; чем сильнее различия в представленности, тем меньше значение коэффициента (MacArthur 1955, Shannon & Weaver 1964).

Бета-разнообразие — это характеристика изменчивости состава сообществ в зависимости от условий или разницы в разнообразии между сообществами (Whittaker 1970). Для описания бета-разнообразия требуется охарактеризовать степень композиционных различий микробиоты в каждом типе образцов (средовые образцы трех зон и организменные образцы пяти групп моллюсков в двух точках взятия проб). Чтобы в этом анализе уравнивать влияние OTU разной численности и проб с разным суммарным числом прочтений, данные предварительно стандартизовали с использованием двойной висконсинской стандартизации — двухэтапной процедуры, в которой численности OTU сперва стандартизуют с использованием их максимумов, затем численности OTU в образцах делят на суммарные численности всех OTU. По подготовленным таким образом данным была вычислена матрица коэффициентов различия Брея-Куртиса между всеми образцами (Bray & Curtis 1957). Эта матрица была использована для ординации образцов

по степени сходства таксономического состава и обилий OTU с использованием метода неметрического многомерного шкалирования (nMDS). Качество ординации оценивали при помощи величины *stress1* (Kruskal 1964). Анализ был проведен при помощи пакета *vegan* (Oksanen et al. 2019). Графики неметрического многомерного шкалирования выстроены при помощи пакета *ggplot2* (Wickham 2009).

Взаиморасположение центроидов облаков проб из разных биотопов и разных видов моллюсков оценили при помощи расстояния Махаланобиса, вычисленного в пространстве ординации, полученной при помощи анализа главных координат (principal coordinates analysis, Gower 1966) по матрице коэффициентов Брея-Куртиса.

При помощи пермутационного дисперсионного анализа на основе матриц расстояний (perMANOVA, Anderson 2001) оценили, как точка сбора, тип образца (биотоп для средовых образцов; сочетание биотопа и вида моллюска для кишечных проб) и взаимодействие этих факторов влияют на композиционные особенности микробных сообществ. В анализе использовали матрицу коэффициентов Брея-Куртиса, вычисленную на предыдущем этапе. Значимость влияния факторов тестировали с использованием 100000 пермутаций. Поскольку микробиомы проб из разных биотопов потенциально не сопоставимы друг с другом по составу, ограничили возможности перестановки значениями из биотопов одного типа. Для выполнения perMANOVA и проверки выполнения условий его применимости использовали функции из пакета *vegan*. Условия применимости perMANOVA были соблюдены, т. к. значимых различий внутригрупповых расстояний не было выявлено.

После perMANOVA провели серию post-hoc попарных сравнений, чтобы оценить значимость различий микробиомов из кишечника литторин и образцов среды, в которой они обитали. Чтобы сохранить во множественных сравнениях вероятность ошибки I рода на уровне $\alpha = 0.05$, уровень статистической значимости скорректировали по методу Хольма-Бонферрони (Holm 1979).

При помощи пакета *metacoder* (Gilmore et al. 2019, Foster et al. 2017) была построена тепловая карта-дерево (heat-tree). С ее помощью мы на нескольких таксономических уровнях визуально оценили сходство эукариотической микробиоты из кишечника каждой группы моллюсков (виды *Littorina* и подвиды *L. saxatilis*) со средовым микробиомом соответствующей зоны литорали. Для удобства анализа из общих тепловых карт были изолированы ветви на уровне отрядов.

Результаты и обсуждение

Мы использовали 53 достоверно идентифицированные таксономические единицы, чтобы охарактеризовать, с какими микроорганизмами контактируют в природных условиях литторины трех видов (*L. saxatilis*, *L. fabalis*, *L. littorea*) и трех экотипов *L. saxatilis* (крабовая форма (C), верхняя (WH) и нижняя (WL) скальные формы), населяющие три типа биотопов; оценить, какие эукариотические микроорганизмы попадают в пищеварительную систему (и вероятно, являются пищевыми объектами), т.е. насколько отличается средовые и кишечные сообщества по составу и разнообразию. Наш дизайн эксперимента позволяет охарактеризовать в сравнительном ключе влияние на состав кишечного сообществ таких факторов как «вид моллюска» и «тип биотопа».

Исследуемые моллюски относятся к соскребателям микроскопических субстратов (micrograzers, Reid, 1996). В связи с этим можно ожидать, что основной их пищей будут мелкие объекты: одноклеточные организмы, одноклеточные стадии жизненного цикла многоклеточных или микроскопические многоклеточные организмы. Хотя следует отметить, что до сих пор в литературе были представлены данные только о питании литторин на макро- и микроводорослевых субстратах (Lubchenco 1980; Watson & Norton, 1885, 1987; McQuaid, 1996; Lotze & Worm, 2000).

По результатам нашего анализа во всем исследованном материале наиболее обильны следующие группы эукариотических организмов: Rhodophyta, Ascomycota, Chlorophyta, Ciliophora, Ochrophyta, Arthropoda и Eucaryota unclassified.

Идентифицированы протисты, например, такие Ciliophora, как Oligohymenophorea, Phyllopharyngea (например, *Brooklynella* и др.); представители жгутиконосцев Bicosoecida и Dinophyceae; представители Ascomycota (Dothideomycetes и Eurotiomycetes) и Oomycota (Peronosporomycetes). Некоторые виды рода *Brooklynella* являются паразитами рыб (Calado et al. 2017); представители, идентифицированные нами во многих средовых и некоторых кишечных образцах, потенциально могут быть паразитами гастропод. Bicosoecida, Dinophyceae и Ascomycota, как правило, живут свободно, в то время как Peronosporomycetes – оомицеты, большая часть которых является паразитами многоклеточных животных и растений (Agrios 2005, Vettraino 2005). Также и в кишечных, и в средовых образцах были отмечены одноклеточные (Naviculares и Fragilariales из Diatomea, Ochrophyta) и многоклеточные (микроскопическая *Ulvella* из Chlorophyta, таллоидные *Ceramium* и *Hildenbrandia* из Florideophycidae) водоросли. Диатомовые водоросли – многочисленный компонент микропланктона практически любого водоема, *Ceramium* и *Hildenbrandia* –

некальцифицированные красные водоросли, обрастатели литоральных каменистых субстратов, формируют небольшие кустистые талломы (*Ceramium*) и двуслойные корки (*Hildenbrandia*).

Из многоклеточных животных был зарегистрирован материал различных Crustacea (Maxillopoda), в том числе, планктонных Copepoda (например, Harpacticoida, Calanoida) и крупных представителей свободноживущих Nematoda (Monhysterida). Эти организмы скорее всего были идентифицированы на стадии яиц и/или личинок (присутствие тел взрослых организмов маловероятно в силу текстуры соскребаемого материала, хотя и не может быть исключено). Все эти организмы, вероятнее всего, являются свободноживущими или, по крайней мере, в норме не ассоциированными с гастроподами представителями литоральной микробиоты. Присутствие генов этих животных не только в среде, но и в составе кишечной массы может быть объяснено случайным или направленным поглощением микроскопических стадий онтогенеза этих объектов литторинами в ходе питания

Среди идентифицированных таксонов единично отмечены те, что с высокой долей вероятности представлены средовой ДНК (environmental DNA) организмов, а не самими организмами. Обилие таких таксонов, идентифицированных как млекопитающие, рыбы или птицы было минимальным и отсеивалось на начальных этапах статистической обработки. Этот генетический материал, вероятно, поступает в организмы моллюсков при случайном заглатывании распространенной в среде обитания слизи, фекалий или фрагментов покровов макроорганизмов.

Доминантными таксонами для средовых образцов оказались (в порядке сокращения обилия): Florideophyceae, Arthropoda, Ascomycota, Chlorophyta, Ciliophora. Порядок лидирующих по обилию таксонов в кишечных образцах иной: Arthropoda, Florideophyceae, Ascomycota, Ciliophora, Chlorophyta. Это различие может объясняться избирательностью моллюсков в выборе пищевого объекта; симбиотическими отношениями или особенностью строения пищевых объектов (например, строение и состав кутикулы артропод), в связи с которыми срок переваривания некоторых микроорганизмов возрастает и позволяет ДНК этих организмов накапливаться в кишечнике моллюсков.

Далее будет рассмотрен разброс характеристик таксономического богатства и разнообразия Шеннона в образцах одного типа (кишечные, средовые) и отличия образцов разных типов друг от друга (Таблица 2).

Средовые образцы демонстрируют несколько большее таксономическое богатство в обеих исследованных точках сбора (Ramsö – в среднем $11,4 \pm 1,3$ OTU на пробу, Arsholmen – в среднем $10,2 \pm 0,9$ OTU на пробу). Разнообразие Шеннона шире всего для средовых проб, отобранных в Ramsö ($H' = 1,3 \pm 0,4$), и достигает минимального значения для средового материала из Arsholmen ($H' = 0,9 \pm 0,4$). Этот показатель варьирует незначительно среди всех типов образцов, и сообщество в целом можно охарактеризовать как бедное. Моллюски, могут направленно выбирать соскребаемые субстраты, что приводит к несколько более низкому разнообразию таксонов в кишечных образцах. Примечательно, что набор «выедаемых» групп, согласно нашим данным (см. Приложение 2), является стереотипным для литторин разных видов.

точка	тип образца	Таксономическое богатство (S)	Разнообразие Шеннона (H')
Arsholmen	кишка	$8,3 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,2$
Arsholmen	среда	$10,2 \pm 0,9$	$0,9 \pm 0,4$
Ramsö	кишка	$7,3 \pm 1,1$	$1,1 \pm 0,2$
Ramsö	среда	$11,4 \pm 1,3$	$1,3 \pm 0,4$

Таблица 2. Обилие таксонов и разнообразие Шеннона в образцах разных типов. Таксономическое богатство – среднее число OTU в пробе определенной категории. Для всех значений индексов указаны 95% доверительные интервалы.

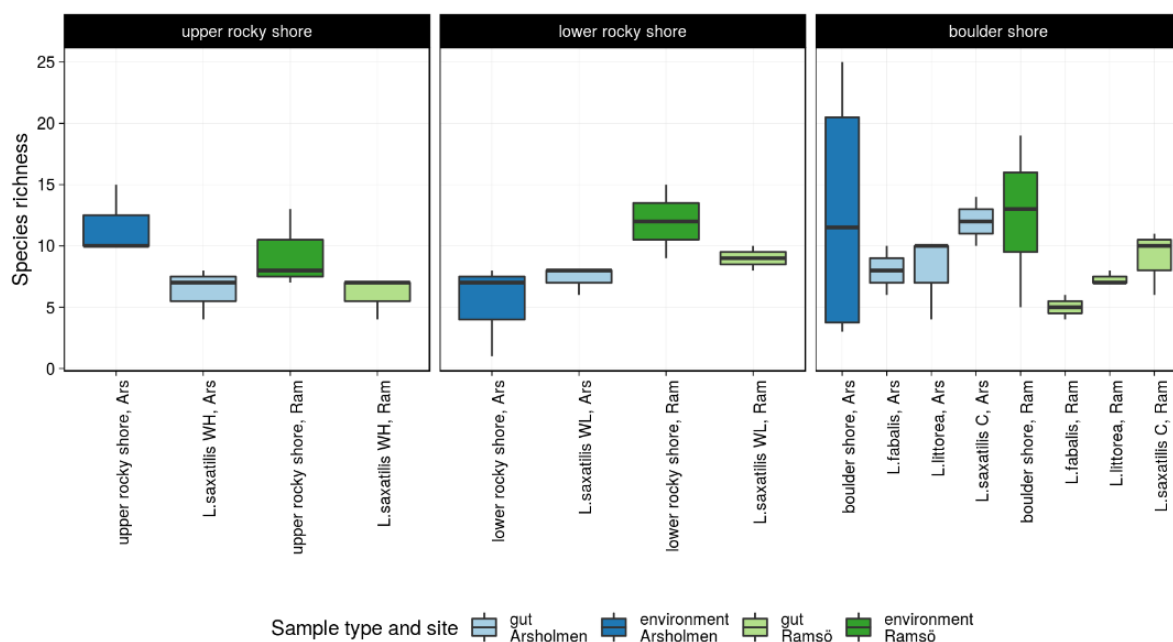


Рис. 3. Таксономическое богатство (среднее число OTU в пробе определенной категории) в средовых образцах и образцах кишечника различных видов *Littorina*. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Синий – средовые образцы, о. Arsholmen; голубой – кишечные образцы, о. Arsholmen. Темно-зеленый – средовые образцы, о. Ramsö; светло-зеленый – кишечные образцы, о. Ramsö. Морфотипы *L. saxatilis*: крабовая форма (C), верхняя скальная форма (WH) и нижняя скальная форма (WL). Границами окрашенных прямоугольников являются 1-й и 3-й квартили, поперечная линия указывает медианное значение индекса, границы продольных линий – минимум и максимум.

Таксономическое богатство в кишечных образцах никогда не превышает таковое для средовых, только приближаясь к нему в случае *L. saxatilis* из нижней зоны скал в Arsholmen (см. Рис. 3). В средовых образцах каменистого биотопа таксономическое богатство варьирует в наибольшей степени. Возможно, эта особенность связана с формированием большего числа микрониз в этой зоне литорали.

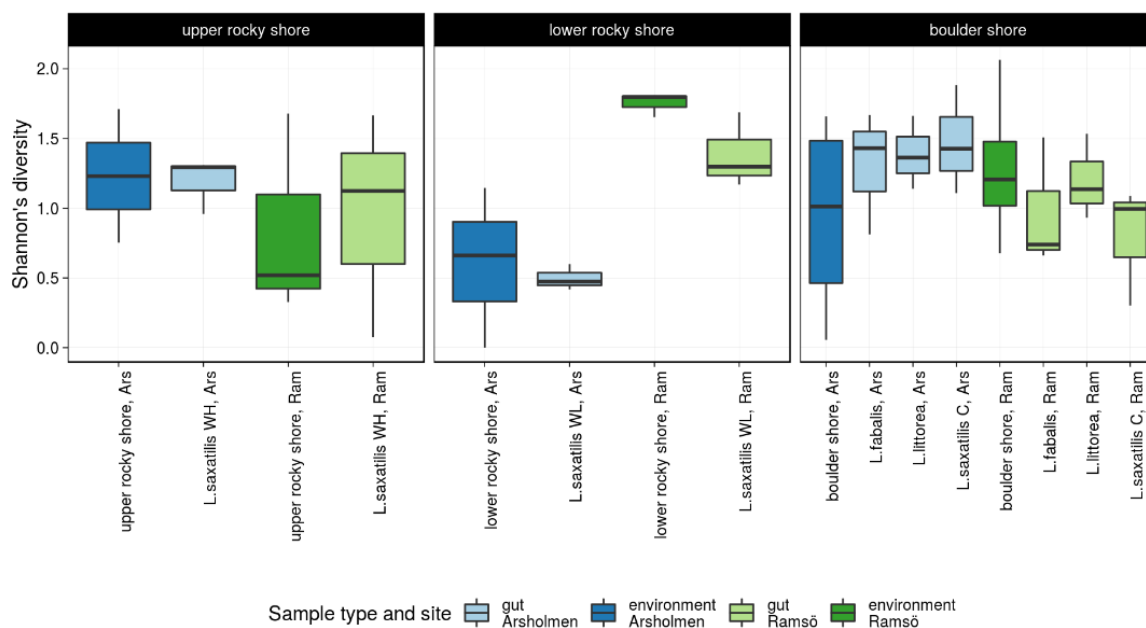


Рис. 4. Индекс разнообразия Шеннона в средовых образцах и образцах кишечника различных видов *Littorina*. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Синий – средовые образцы, о. Arsholmen, голубой – кишечные образцы, о. Arsholmen. Темно-зеленый – средовые образцы, о. Ramsö, Светло-зеленый – кишечные образцы, о. Ramsö. Морфотипы *L. saxatilis*: крабовая форма (C), верхняя скальная форма (WH) и нижняя скальная форма (WL). Границами закрашенных прямоугольников являются 1-й и 3-й квартили, поперечная линия указывает медианное значение индекса, границы продольных линий – минимум и максимум.

Таксономическое разнообразие в образцах разных типов сильно варьирует (Рис. 4.), но в большинстве случаев индекс разнообразия Шеннона в средовых образцах выше, чем в соответствующих кишечных пробах, и варьирует в большей степени. Кишечные образцы разных видов и экотипов с острова Arsholmen, при этом также демонстрируют относительно высокое разнообразие. В большей части кишечных образцов с о. Arsholmen были встречены редкие для моллюсков из Ramsö OTU: Ceramium, Pleosporaceae, Bacillariophyceae, Cylindrotheca.

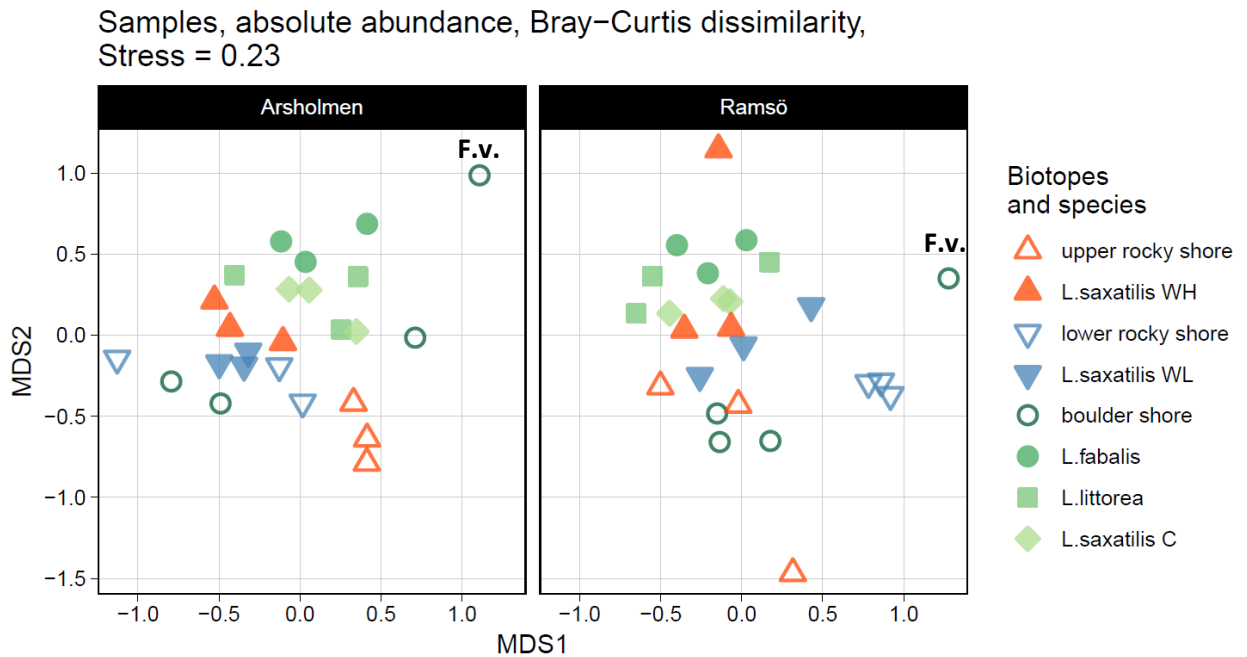


Рис. 5. Сравнение типов образцов в двух точках взятия проб. nMDS-ординация по матрице коэффициентов Брея-Куртиса, который оценивает композиционное сходство-различие. Стресс = 0,23. Закрашенные фигуры – кишечные образцы. Контурные – средовые образцы. Зеленый цвет – зона валунов. Синий – нижние скалы. Оранжевый – верхние скалы. Морфотипы *L. saxatilis*: крабовая форма (C), верхняя скальная форма (WH) и нижняя скальная форма (WL). 4 символа средовых образцов зоны валунов включают соскоб с *F. vesiculosus* (F.v.) и три соскоба с поверхности камней, для остальных средовых образцов взято по 3 соскоба с неживого субстрата.

Анализ nMDS позволяет выявить следующие тенденции.

(1) Все кишечные образцы формируют достаточно компактную группу – это значит, что они более похожи друг на друга по составу и соотношению таксономических групп микробиоты, тогда как разброс средовых образцов несколько больше, что отражает их большую изменчивость. Такой паттерн ординации подтверждает ожидания потенциальной избирательности в отношении пищевых объектов моллюсками и гетерогенность среды.

(2) Кишечные образцы трех видов моллюсков, населяющих затишную каменистую зону, демонстрируют сходный паттерн ординации. Образцы *L. fabalis* показывают тенденцию к формированию отдельной группы, тогда как *L. littorea* и крабовая форма *L. saxatilis* практически полностью перекрываются. С одной стороны, это (сходство образцов совместно обитающих моллюсков) подразумевает сильное и стереотипное влияние со стороны биотопа на кишечное сообщество. Однако видно, что средовые образцы данной зоны группируются отдельно от кишечных, что в очередной раз указывает на возможное

наличие избирательности при выборе пищевых объектов или симбиотические отношения моллюсков с организмами, бедно представленными в свободном виде.

Известно, что *L. fabalis* держится на фукоидах (Яценко и Гранович 2002, Гранович и др. 2004; Watson & Norton, 1985, 1987), соскребая биопленки с поверхности талломов, в то время как *L. littorea* и *L. saxatilis* встречаются преимущественно на поверхности камней и соскребают биопленки с них. Паттерн ординации образцов *L. fabalis* несколько отдельно от *L. littorea* и *L. saxatilis* подтверждает дифференциальность населяемых моллюсками этих видов экологических ниш в пределах одного биотопа (в данном случае, нижняя часть пологой каменистой литорали). Некоторая схожесть паттернов питания *L. saxatilis* и *L. littorea* (в противоположность литторинам группы “*obtusata*”) была отмечена в более ранних работах (Lotze & Worm, 2000). Интересно также, что средовой образец соскоба *F. vesiculosus* отстоит от соскобов с поверхности валунов и группируется ближе к образцам *L. fabalis*, а соскобы с камней в то же время – ближе к *L. saxatilis*, что подтверждает высказанное предположение.

(3) Кишечные образцы нижней скалистой формы *L. saxatilis* и соответствующие средовые образцы группируются отдельно от образцов зоны валунов, что свидетельствует в пользу экологических различий данных участков, несмотря на то, что оба этих биотопа относят к нижней литорали. В отличие от зоны валунов, нижняя скальная зона подвергается серьезному волновому воздействию, разнообразие потенциальных пищевых объектов здесь беднее, но их численность выше, например, обрастания *Hildenbrandia*, красной водоросли, формирующей двуслойные корки на поверхности камней (Dethier 1994), занимают большую площадь (личные наблюдения).

(4) Кишечные и средовые образцы верхней части скал острова Arsholmen группируются вместе и более похожи друг на друга, чем образцы из этого же биотопа на острове Ramsö. Примечательно, что кишечные образцы верхней зоны скал тем не менее группируются ближе к кишечным образцам из двух биотопов нижней литорали, чем к образцам среды, в которой они обитали. Разный паттерн группировки образцов может быть связан с низкой стабильностью и неоднородностью биотопа верхней литорали. В дальнейших

исследованиях для адекватной оценки разнообразия в такой гетерогенной среде целесообразно использовать большее количество биологических повторностей.

(5) Образцы из двух географически разнесенных точек сбора скорее подтверждают общие друг для друга паттерны (например, тесная группировка кишечных образцов в дали от соответствующих средовых проб; облако точек образцов из зоны валунов), чем подчеркивают различия между географическими точками. Тем не менее, некоторые различия заметны: средовые образцы из верхней зоны скал шире разнесены на ординации в случае о. Ramsö, подтверждая неоднородность верхней литорали. На острове Arsholmen микробиомы моллюсков нижней зоны скал более схожи, чем на острове Ramsö, и средовые образцы более сближены с кишечными, что может быть обусловлено экологическими различиями, точную природу которых можно выяснить впоследствии, повторив исследование в большем количестве географических точек.

Дендрограмма расстояний Махаланобиса (см. Рис.6.) между центрами облаков на ординации (см. Рис. 5.) дублирует некоторые закономерности, отмеченные выше для nMDS, в особенности, высокое сходство кишечных образцов всех моллюсков из зоны валунов. Следует отметить, что и по этим упрощенным данным сходство между средовыми образцами из верхней зоны скал разных островов и между средовыми образцами из нижней зоны скал островов Ramsö и Arsholmen ниже, чем между средовыми образцами из зоны валунов различных географических точек. Это подчеркивает большую гомогенность условий в области валунов по сравнению с зоной скал.

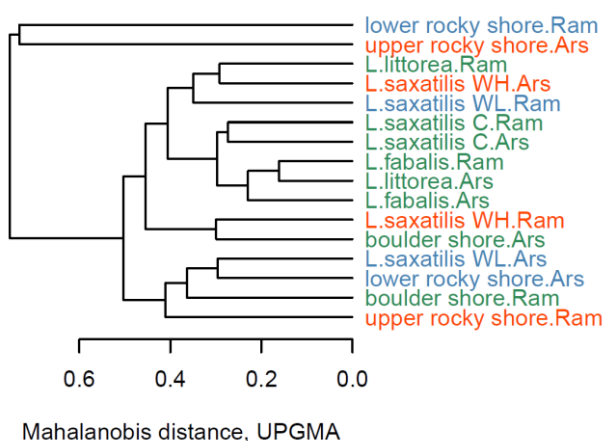
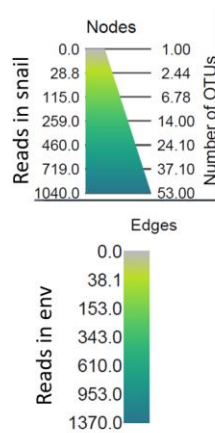
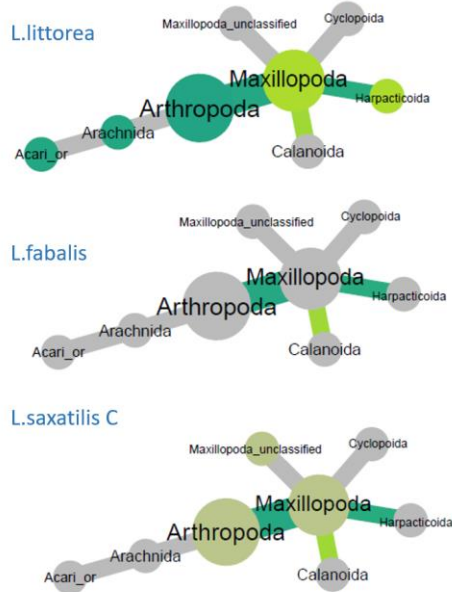


Рис. 6. Дендрограмма расстояния Махаланобиса между центроидами облаков средовых и кишечных образцов, вычисленного в пространстве ординации. Зеленый цвет – зона валунов. Синий – нижние скалы. Оранжевый – верхние скалы. Морфотипы *L.saxatilis*: крабовая форма (C), верхняя скальная форма (WH) и нижняя скальная форма (WL). Ram – остров Ramsö, Ars – остров Arsholmen.

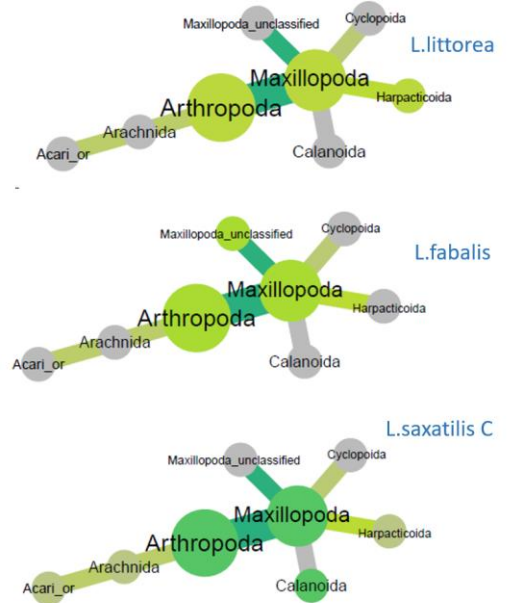
Результаты пермутационного дисперсионного анализа (см. Приложение 3) на основе матриц расстояний (perMANOVA) показали, что есть статистически значимое взаимодействие влияния факторов точка сбора (Ramsö и Arsholmen) и тип пробы (биотоп для средовых образцов; сочетание биотопа и вида моллюска для кишечных проб). То есть, в двух обследованных точках пробы разных типов отличаются друг от друга в разной степени (см. Рис. 5). Микробиомы в разных географических точках похожи, но есть значимые различия микробиомов в пробах разных типов. Тем не менее, мы не можем по результатам *post hoc* теста определить, с чем связана значимость взаимодействия и какие именно группы проб обуславливают эти различия. Нам не удалось обнаружить значимых различий при попарных сравнениях образцов разных типов с учетом поправки на множественные сравнения. Вероятно, это связано с недостаточной мощностью теста в связи с малым объемом выборки.

Состав микробиоты кишечных образцов отличается от состава средовых образцов (см. Рис.5). Конкретные различия эукариотической микробиоты из кишечника каждой группы моллюсков (виды *Littorina* и экотипы *L. saxatilis*) со средовым микробиомом соответствующей зоны литорали отражены на тепловых картах. На каждом таксономическом уровне цвет ребер символизирует обилие микробиоты (количество прочтений) в пробах среды, обилие микробиоты в кишечных образцах показано цветом прилежащих узлов.

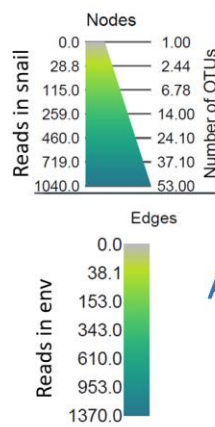
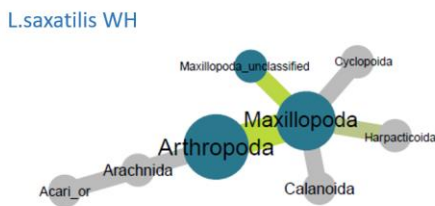
Ramsö. Boulder shore



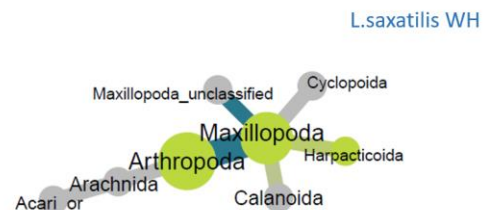
Arsholmen. Boulder shore



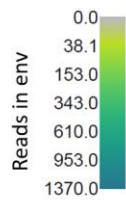
Ramsö. Upper rocky shore



Arsholmen. Upper rocky shore



Ramsö. Lower rocky shore



Arsholmen. Lower rocky shore

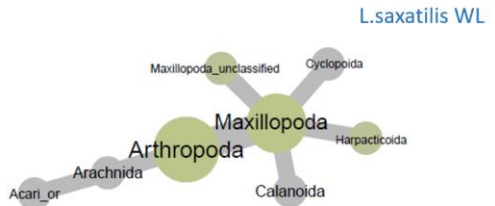
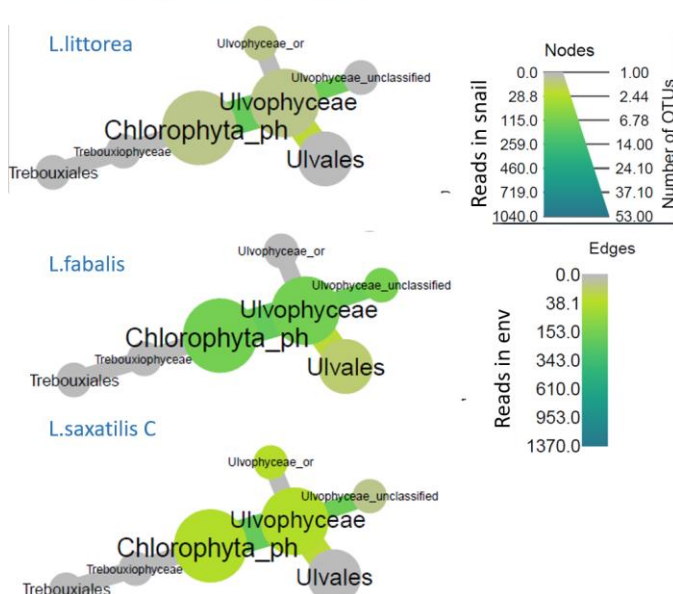


Рис. 7. Сопоставление количества прочтений для представителей Arthropoda в кишечных образцах различных видов Littorina и соответствующих средовых образцах. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Размеры узлов пропорциональны числу OTU, причисленных к таксону определенного ранга, во всем наборе данных; цвет узла соответствует числу прочтений в образцах, выделенных из организмов моллюсков; цвет ребер — число ридов в средовых пробах.

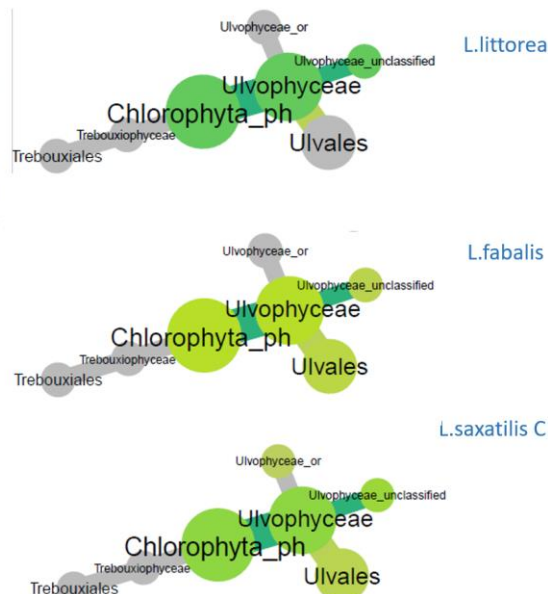
Сигнал от представителей Maxillopoda более выражен в средовых образцах затишной части каменистой литорали по сравнению с кишечными образцами обитателей этих участков.

(рис. 7). Для скалистых участков ситуация менее однозначна. В средовых образцах верхней части скал острова Ramsö и в соскобах нижней части скал острова Arsholmen количество прочтений, определяемых как *Maxillopoda*, меньше, чем в кишечных образцах *L. saxatilis*, обитающих там. В нижнем участке скал острова Ramsö и верхней части скал острова Arsholmen соотношение противоположное. По всей видимости, литторины редко используют этих ракообразных в пищу и только в случае недостатка других кормовых объектов прибегают к питанию представителями *Calanoida* и *Harpacticoida*. Условия дефицита пищевых ресурсов могут возникать и на засушливых зонах в верхней части скал, и в местах наиболее интенсивной прибойности, что не противоречит полученным данным. Однако, использование любых жизненных стадий ракообразных в качестве пищевых объектов не описывалось ранее в литературе; на данном этапе нельзя однозначно заключить о наличии реакций избегания или, наоборот, избирания поглощения данных членистоногих, так как такой паттерн присутствия и обилия ДНК *Maxillopoda* в средовых и кишечных образцах мог возникнуть случайно (за счет случайного попадания в кишечник моллюсков при питании и случайного же распределения ракообразных в среде).

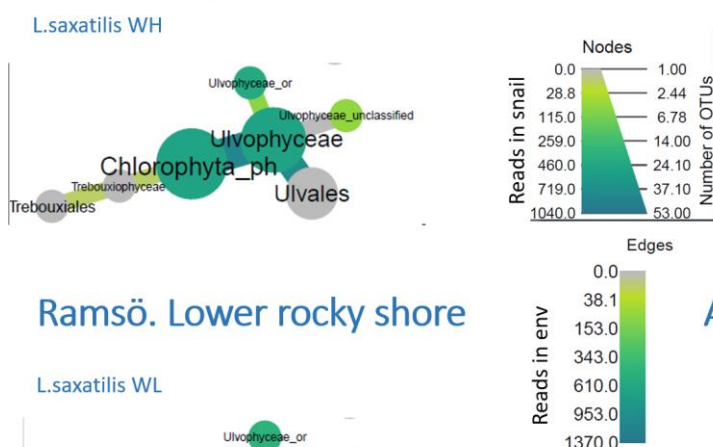
Ramsö. Boulder shore



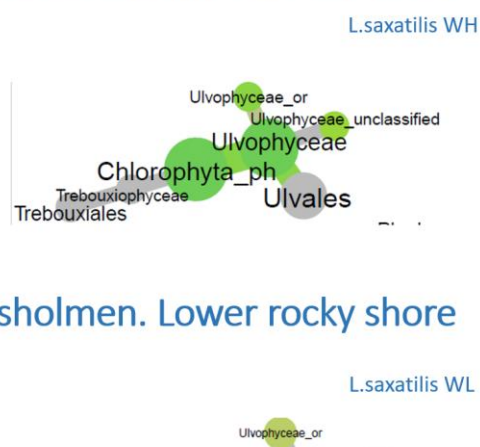
Arsholmen. Boulder shore



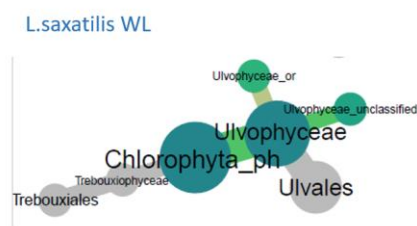
Ramsö. Upper rocky shore



Arsholmen. Upper rocky shore



Ramsö. Lower rocky shore



Arsholmen. Lower rocky shore

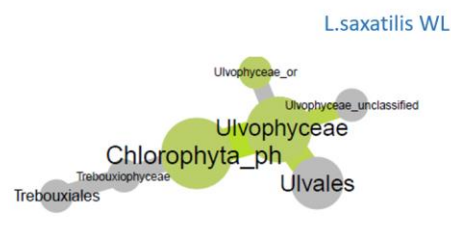
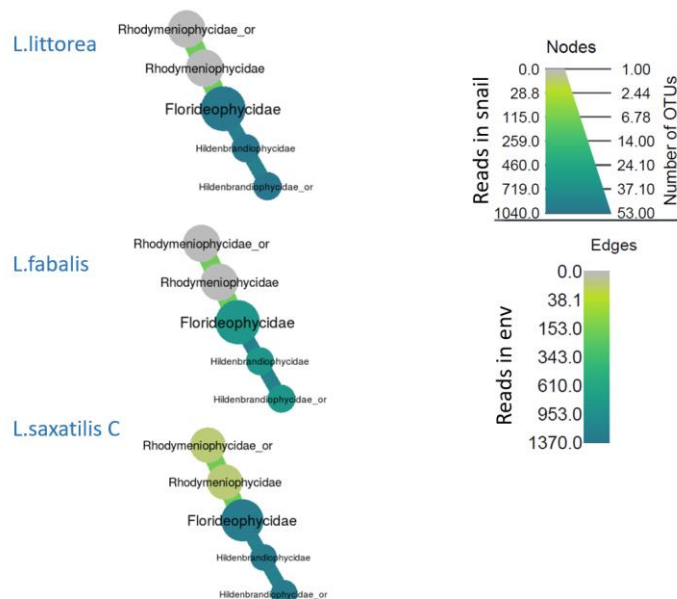


Рис. 8. Сопоставление количества прочтений для представителей Chlorophyta в кишечных образцах различных видов Littorina и соответствующих средовых образцах. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Размеры узлов пропорциональны числу OTU, причисленных к таксону определенного ранга, во всем наборе данных; цвет узла соответствует числу прочтений в образцах, выделенных из организмов моллюсков; цвет ребер — число прочтений в средовых пробах.

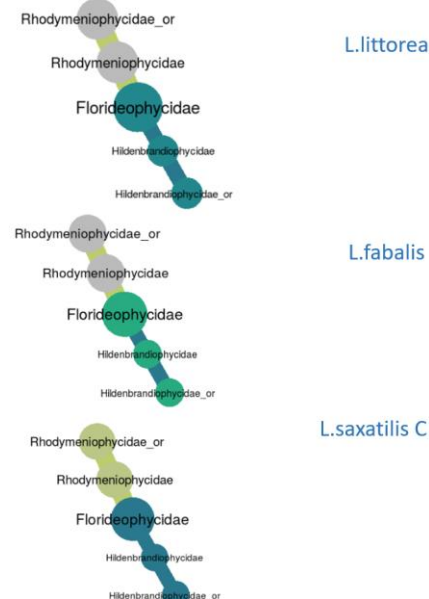
Относительное обилие Ulvophyceae (Chlorophyta) высоко в средовых образцах зоны валунов и сокращается приблизительно на порядок в кишечных образцах этой зоны (см. Рис. 8). В соскобах с верхней части скал острова Ramsö и с нижней части скал острова

Arsholmen сигнал присутствия представителей этого таксона сильнее, чем в материале из кишечника соответствующих мофотипов *L. saxatilis*. Для нижнего участка скал острова Ramsö и верхней части скал острова Arsholmen соотношение обратное. Вероятно, нитчатые зеленые водоросли могут активно поглощаться литторинами при питании в некоторых случаях, однако не относятся к предпочитаемому моллюсками пищевому субстрату (что согласуется с представленной в литературе информацией (Watson & Norton, 1985, 1987; Lotze & Worm, 2000)). Отсутствие однозначной корреляции обилия сигнала от Ulvophyceae с типом биотопа или видом моллюска может отражать их неупорядоченное распространение в среде и, соответствующее, «пятнистое» потребление моллюсками.

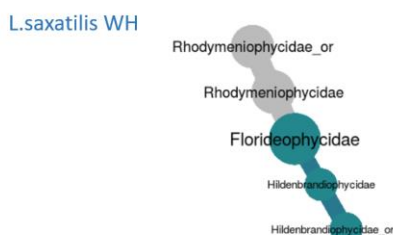
Ramsö. Boulder shore



Arsholmen. Boulder shore



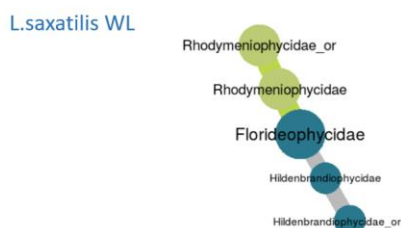
Ramsö. Upper rocky shore



Arsholmen. Upper rocky shore



Ramsö. Lower rocky shore



Arsholmen. Lower rocky shore

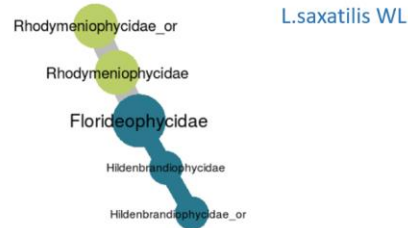
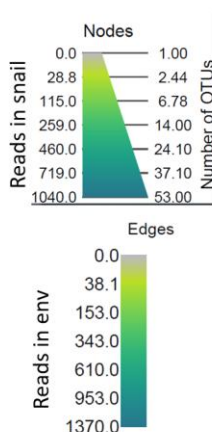
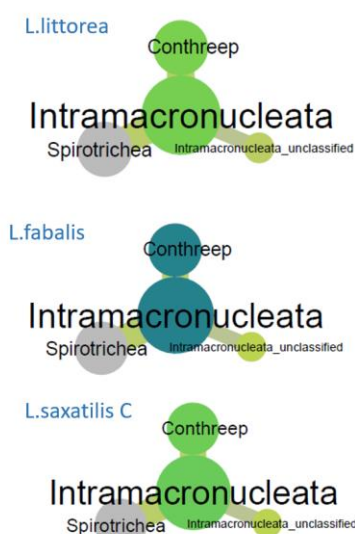


Рис. 9. Сопоставление количества прочтений для представителей Florideophycidae в кишечных образцах различных видов *Littorina* и соответствующих средовых образцах. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Размеры узлов пропорциональны числу OTU, причисленных к таксону определенного ранга, во всем наборе данных; цвет узла соответствует числу прочтений в образцах, выделенных из организмов моллюсков; цвет ребер — число ридов в средовых пробах.

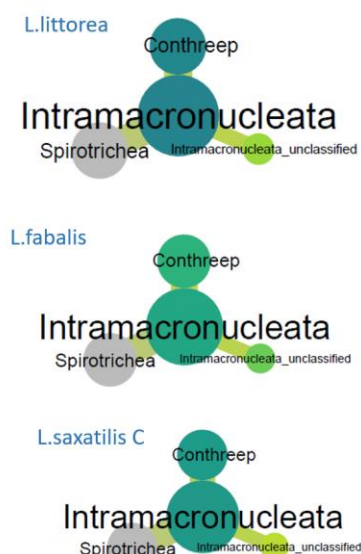
Обилие ДНК красных водорослей в большинстве кишечных образцов незначительно отличается от такового в средовых образцах (Рис.9). Тем не менее встречаются пробы, где

соотношение обилия микробиоты в среде и организме моллюска смещено. В кишечных образцах *L. fabalis* присутствует в 2 раза меньше Hildenbrandiophycidae, чем в средовых образцах каменистой зоны, причем, отличия сильнее выражены в образцах острова Arsholmen. Кишечные образцы *L. saxatilis* в верхней зоне скал острова Arsholmen и в нижней зоне скал острова Ramsö характеризуются на 2 порядка более высоким количеством прочтений Florideophycidae, чем соответствующих средовых образцах. Примечательно, что именно в этих образцах присутствуют не только Hildenbrandiophycidae, но и Rhodymeniophycidae. Вероятно, в изобилии представленные практически во всех изученных биотопах Florideophycidae активно употребляется в пищу всеми литторинами; в предшествующих исследованиях питание литторин микроскопическими красными водорослями не выявлялось.

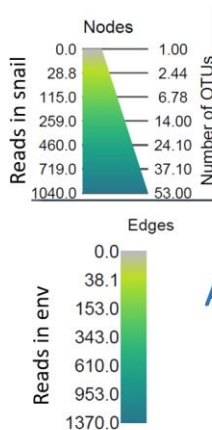
Ramsö. Boulder shore



Arsholmen. Boulder shore



Ramsö. Upper rocky shore



Arsholmen. Upper rocky shore



Ramsö. Lower rocky shore



Arsholmen. Lower rocky shore

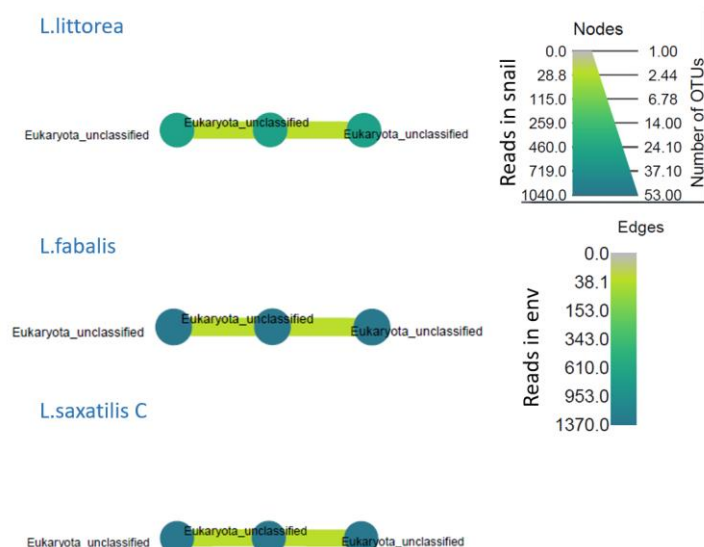


Рис. 10. Сопоставление количества прочтений для представителей Intramacronucleata в кишечных образцах различных видов Littorina и соответствующих средовых образцах. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Размеры узлов пропорциональны числу OTU, причисленных к таксону определенного ранга, во всем наборе данных; цвет узла соответствует числу прочтений в образцах, выделенных из организмов моллюсков; цвет ребер — число ридов в средовых пробах.

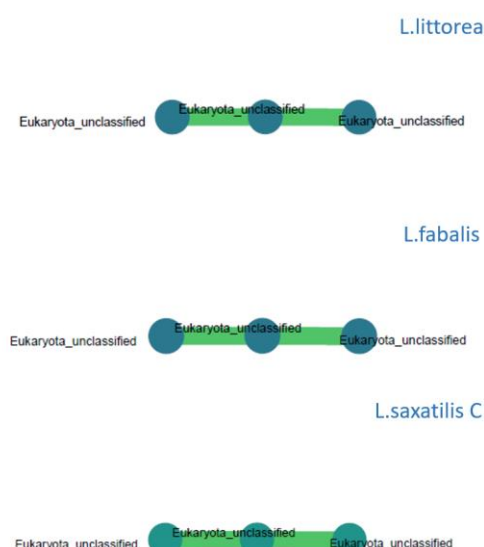
Различные Ciliophora более обильны в кишечных образцах, чем в средовых, во всех случаях, кроме *L. saxatilis* из нижних скальных участков островов Ramsö и Arsholmen. Эта закономерность может отражать направленное выедание инфузорий моллюсками, в

результате которого обилие этих протистов в среде потенциально может иссякать. Альтернативным (и более вероятным) объяснением могут быть симбиотические отношения между инфузориями и гастроподами рода *Littorina*. Действительно, среди Ciliophora встречаются комменсальные и паразитические представители, обитающие в ассоциации с моллюсками (Янковский 1973). В частности, в выводковых сумках самок *L. saxatilis* была описана симбиотическая инфузория *Protophrya ovicola* (Kofoid, 1903); она часто встречается в том числе в популяциях литторин Северного моря; ее паразитический статус (согласно исходному описанию) является спорным, т.к. негативное влияние не известно, при этом есть данные о том, что присутствие и обилие данных простейших никак не влияет на число и здоровье развивающихся в выводковой сумке эмбрионов (Sokolova, 1995). Присутствие инфузорий в кишечнике литторин ранее описано не было. Возможно, в дальнейшем удастся более однозначно определить роль протистов в жизнедеятельности моллюсков-хозяев.

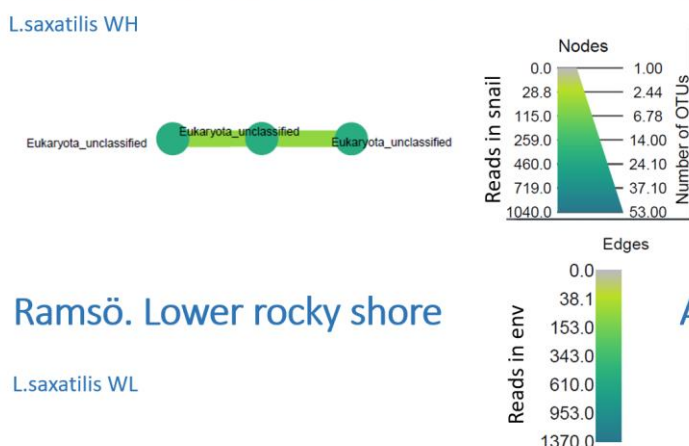
Ramsö. Boulder shore



Arsholmen. Boulder shore



Ramsö. Upper rocky shore



Arsholmen. Upper rocky shore



Ramsö. Lower rocky shore



Arsholmen. Lower rocky shore



Рис. 11. Сопоставление количества прочтений для эукариот, не определенных в ходе автоматизированного BLAST-анализа, в кишечных образцах различных видов *Littorina* и соответствующих средовых образцах. Upper rocky shore – верхняя зона скал, lower rocky shore – нижняя зона скал, boulder shore – зона валунов. Размеры узлов пропорциональны числу OTU, причисленных к таксону определенного ранга, во всем наборе данных; цвет узла соответствует числу прочтений в образцах, выделенных из организмов моллюсков; цвет ребер — число ридов в средовых пробах.

Все прочтения, для которых алгоритму не удалось установить таксономическое положение, были объединены в одну группу Eucariota_unclassified. Сигнал присутствия от организмов этой группы был более сильным в образцах из материала кишки в сравнении со средовыми

образцами во всех случаях, кроме *L. saxatilis* WL острова Ramsö, где количества прочтений для средовых и кишечных проб сравнивались. В результате проведения процедуры индивидуального BLAST-анализа удалось установить, что в эту группу вошли организмы, близкие родам свободно живущих круглых червей *Chromadorina* и *Eurystomina* (Nematoda), а также жгутиконосцу рода *Halocafeteria* (Heteroconta). В данном случае также нельзя однозначно определить, является ли высокое обилие ДНК этих эукариот в кишечных образцах результатом симбиотических отношений (хотя близкие рода представлены свободно живущими организмами, полностью исключать возможность симбиоза пока безосновательно); также вероятным объяснением является проявление диетических предпочтений моллюсков вида *Littorina* на побережье Северного моря.

Выводы

1. В составе исследованных эукариотических сообществ микроскопических организмов литоральной зоны Северного моря, в первую очередь, представлены следующие таксоны: Rhodophyta (Florideophyceae), Ascomycota, Chlorophyta, Ciliophora, Ochrophyta, Arthropoda (Maxillopoda) и Eucaryota unclassified.
2. Общий уровень разнообразия видов в сообществах и обилие отдельных видов в них в средовых образцах ожидаемо выше, чем в сообществах кишечника литторин.
3. Степень вариабельности средовых сообществ существенно выше, чем кишечных; эти сообщества характеризуются разными наборами доминантных таксонов, что в совокупности указывает, с одной стороны, на различия условий обитания литторин разных экотипов; а с другой – на возможность наличия избирательности при питании литторин.
4. Состав кишечных сообществ у моллюсков 3 разных видов (*L. fabalis*, *L. littorea* и *L. saxatilis*), населяющих общий биотоп (нижняя зона каменистой литорали) более сходен, чем таковой трех экотипов *L. saxatilis*, населяющих разные биотопы.
5. *L. fabalis* демонстрирует несколько отдельный композиционный паттерн состава кишечного сообщества в сравнении с *L. littorea* и *L. saxatilis*, что вероятно, связано с микробиотопическими предпочтениями этого вида и согласуется с описанными ранее пищевыми предпочтениями данного вида.
6. Присутствие и обилие ДНК представителей Arthropoda и Chlorophyta в средовых и кишечных образцах носит неупорядоченный характер и не коррелирует определенно ни с типом биотопа, ни с видом моллюска.
7. Сравнительный анализ состава средовых и кишечных образцов позволяет предполагать преимущественное потребление группы Hildenbrandiophycidae всеми исследованными видами и во всех исследованных биотопах.
8. Сравнительный анализ состава средовых и кишечных образцов позволяет предполагать преимущественное потребление группы Hildenbrandiophycidae всеми исследованными видами и во всех исследованных биотопах, что никогда ранее не документировалось исследователями.
9. В исследованных биотопах зарегистрировано избирательное накопление в кишечнике литторин представителей Conthreep (Intramacronucleata, Ciliophora),

потенциально представляющих симбиотические (в том числе, паразитические) организмы.

Благодарности

Хочу поблагодарить моих однокурсников, сотрудников кафедры за моральную поддержку в ходе исследований и написания работы.

Отдельно выражаю благодарность людям, без которых проведение исследования было бы невозможным:

Мальцевой Арине Леонидовне за титаническое терпение и неустанное покровительство на каждом этапе подготовки дипломного проекта,

Варфоломеевой Марине Александровне за помощь в реализации статистической обработки и трактовке результатов,

Пановой Марине Владимировне за поддержку в ходе подготовки библиотек и биоинформатической части обработки данных,

Kerstin Johannessson за размещение на станции Tjarno,

Грановичу Андрею Игоревичу за идейное, организационное и финансовое обеспечение работы научной группы в городских и экспедиционных условиях, а также экспертно-консультационное сопровождение данного исследования,

Михайловой Наталье Аркадьевне, Грановичу Андрею Игоревичу и Kerstin Johannessson за высокопрофессиональную помощь при сборе и подготовке материала.

Благодарю сотрудников Национальной геномной инфраструктуры (NGI) Швеции за проведение процедур секвенирования.

Работа выполнена при поддержке грантов KVA-фонда Шведской королевской академии наук (грант 3157/253144505), РФФИ (грант 19-04-00392 А) и РНФ (грант 19-14-00321), а также ресурсных центров Научного парка СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Обсерватория экологической безопасности».

Список использованной литературы

1. Agrios, George (2005). Plant Pathology. *Elsevier*. p. 409.
2. Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., & Aksoy, S. (2002). Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nature Genetics*, 32(3), 402–407.
3. Amato, K. R. (2016). Incorporating the gut microbiota into models of human and non-human primate ecology and evolution. *American Journal of Physical Anthropology*, 159, 196–215
4. Anderson, I. (2001). A new method for non parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(2001), 32–46.
5. Archie, E. A., & Tung, J. (2015). Social behavior and the microbiome. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 6, 28–34.
6. Attardo, G. M., Lohs, C., Heddi, A., Alam, U. H., Yildirim, S., & Aksoy, S. (2008). Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: Milk protein production, symbiont populations and fecundity. *Journal of Insect Physiology*, 54(8), 1236–1242.
7. Bojko, J., Grahame, J. W., & Dunn, A. M. (2017). Periwinkles and parasites: the occurrence and phenotypic effects of parasites in *Littorina saxatilis* and *L. arcana* in northeastern England. *Journal of Molluscan Studies*, 83(1), 69-78.
8. Bordenstein, S. R., & Theis, K. R. (2015). Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology*, 13(8), 1–23.
9. Butlin, R. K., Saura, M., Charrier, G., Jackson, B., André, C., Caballero, A. & Kempainen, P. (2014). Parallel evolution of local adaptation and reproductive isolation in the face of gene flow. *Evolution*, 68(4), 935-949.
10. Calado, R; Olivotto, I; Planas Oliver, M; Holt, JG. (2017). Chapter 19.2.4: *Brooklynella hostilis*. *Marine Ornamental Species Aquaculture*. John Wiley & Sons.
11. Canbäck B, André C, Galindo J, Johannesson K, Johansson T, Panova, M, et al. The *Littorina* sequence database (LSD)—an online resource for genomic data. *Mol Ecol Resour.* 2012; 12(1): 142-148.
12. Ceja-navarro, J. A., Vega, F. E., Karaoz, U., Hao, Z., Jenkins, S., Lim, H. C., Brodie, E. L. (2015). Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nature Communications*, 6(May), 1–9.

13. Conde-Padín P, Caballero A, Rolán-Alvarez E. Relative role of genetic determination and plastic response during ontogeny for shell-shape traits subjected to diversifying selection. *Evolution Int J Org Evolution*. 2009; 63(5): 1356-1363.
14. Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2015). More than a Gut Feeling: The Microbiota Regulates Neurodevelopment and Behavior. *Neuropsychopharmacology*, 40(1), 241–242.
15. Degnan, P. H., & Moran, N. A. (2008). Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(21), 6782–6791.
16. Degnan, P. H., Yu, Y., Sisneros, N., Wing, R. A., & Moran, N. A. (2009). Hamiltonella defensa, genome evolution of protective bacterial endosymbiont from pathogenic ancestors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(22), 9063-9068.
17. Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., & Pfrender, M. E. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular ecology*, 26(21), 5872-5895.
18. Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Molecular Psychiatry*.
19. Dethier, M. N. (1994). The ecology of intertidal algal crusts: variation within a functional group. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.
20. Douglas, A. E. (2014). Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 17–34.
21. Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699–735.
22. Ferreira, S. H., Moncada, S., & Vane, J. R. (1971). Nature Publishing Group. *Nature*, 232(5313), 655–657.
23. Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut © 2012 *Landes Bioscience Gut Microbes*, 3:4(August), 289–306.
24. Foster, J. A., & McVey Neufeld, K. A. (2013). Gut-brain axis: How the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neurosciences*, 36(5), 305–312.
25. Freeland, W. J, & Janzen, D. H. (1974). Strategies in Herbivory By Mammals: the Role of Plant Secondary Compounds. *The American Naturalist* 108(961), 269–289.
26. Galindo, Juan and John W. Grahame. (2014). “Ecological Speciation and the Intertidal Snail *Littorina Saxatilis*. *Advances in Ecology* 2014:9. Retrieved (<http://www.hindawi.com/journals/ae/2014/239251/>).

27. Gerardo, N. M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S. M., De Vos, M., & Heddi, A. (2010). *Immunity and other defenses in pea aphids, Acyrthosiphon pisum. Genome biology, 11*(2), R21.
28. Gilmore, R., Hutchins, S., Zhang, X., & Vallender, E. (2019). MicrobiomeR: An R Package for Simplified and Standardized Microbiome Analysis Workflows. *Journal of Open Source Software, 4*(35), 1299.
29. Gower J. C. (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis *Biometrika. 53* (3-4), 325-338.
30. Granovitch A.I., Mikhailova N.A. (2004) Rocky shore trematodes of the west coast of Sweden: distribution and life cycle strategies. *Acta Parasitologica, 49*(3), 228-236.
31. Granovitch AI, Yagunova EB, Maximovich AN, Sokolova IM. (2009) Elevated female fecundity as a possible compensatory mechanism in response to trematode infestation in populations of *Littorina saxatilis* (Olivi). *Int J Parasitol. 39*(9): 1011-1019.
32. Granovitch, Andrei I., Alexei N. Maximovich, Alina V. Avanesyan, Zinaida I. Starunova, & Natalia A. Mikhailova. (2013). Micro-Spatial Distribution of Two Sibling Periwinkle Species across the Intertidal Indicates Hybridization. *Genetica 141*(7–9): 293–301
33. Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2011). Aphid genome expression reveals host–symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 108*(7), 2849-2854.
34. Heams, T., Lecointre, G., Huneman, P., & Silberstein, M. (2015). Handbook of Evolutionary Thinking in the Sciences.
35. Hogenhout, S. A., Ammar, E.-D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses. *Annual Review of Phytopathology, 46*(1), 327–359.
36. Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics, 6*(2), 65–70.
37. Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T et al (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*.
38. Hull, S. L., J. Grahame, and P. J. Mill (1996) Morphological Divergence and Evidence for Reproductive Isolation in *Littorina Saxatilis* (Olivi) *Northeast England Journal of Molluscan Studies 62*(1):89–99.
39. Hull, S. L., J. Grahame, and P. J. Mill. (1996) Morphological Divergence and Evidence for Reproductive Isolation in *Littorina Saxatilis* (Olivi). *Northeast England Journal of Molluscan Studies 62*(1):89–99.

40. Jari Oksanen, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, R. B. O'Hara, Gavin L. Simpson, Peter Solymos, M. Henry H. Stevens, Eduard Szoecs and Helene Wagner (2019). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.5-4. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
41. Johannesson K, Johannesson B, Lundgren U. (1995) Strong natural selection causes microscale allozyme variation in a marine snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 2602–2606.
42. Johannesson K, Panova M, Kemppainen P, André C, Rolan-Alvarez E, Butlin RK. (2010) Repeated evolution of reproductive isolation in a marine snail: unveiling mechanisms of speciation. *Philos Trans Royal Soc B*. 365(1547): 1735-1747
43. Johannesson K, Tatarenkov A. (1997) Allozyme variation in a snail (*Littorina saxatilis*) – deconfounding the effects of microhabitat and gene flow. *Evolution* 51: 402–409
44. Johannesson, Bo. (1986) Shell Morphology of *Littorina Saxatilis* Olivi: The Relative Importance of Physical Factors and Predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 102(2–3):183–195.
45. Johannesson, Kerstin, Bo Johannesson, and Ullika Lundgren. (1995). Strong Natural Selection Causes Microscale Allozyme Variation in a Marine Snail. *Evolution* 92(September):2602–6.
46. Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y., & Núñez, G. (2013). Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*, 13(5), 321–335.
47. Kofoid, C. A. (1903). On the Structure of *Protophrya ovicola*: a ciliate infusorian from the brood-sac of *Littorina rudis* Don.
48. Kohl, K. D., Weiss, R. B., Cox, J., Dale, C., & Dearing, M. D. (2014). Gut microbes of mammalian herbivores facilitate intake of plant toxins. *Ecology Letters*, 17(10), 1238–1246.
49. Kohl, K. D., Weiss, R. B., Cox, J., Dale, C., & Dearing, M. D. (2014). Gut microbes of mammalian herbivores facilitate intake of plant toxins. *Ecology Letters*, 17(10), 1238–1246.
50. Koura, E. A., Grahame, J., Owen, R. W., & Kamel, E. G. (1990). *Digyalum oweni*, gen. nov., sp. nov., a new and unusual gregarin protozoan from the gut of mollusc *Littorina obtusata* (Prosobranchia: Gastropoda). *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 20(1), 53-59.
51. Kruskal, J.B. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness-of-fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 29, 1--28.

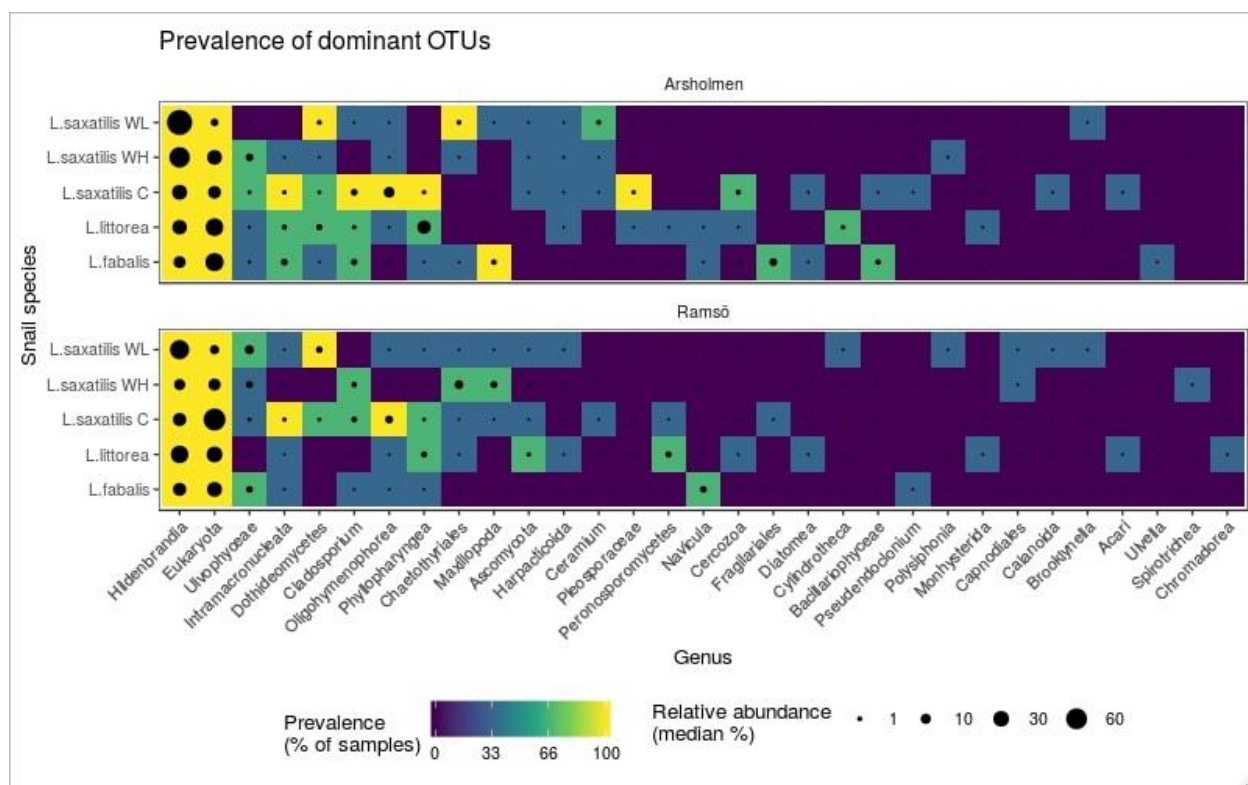
52. Laughton, A. M., Garcia, J. R., Altincicek, B., Strand, M. R., & Gerardo, N. M. (2011). Characterisation of immune responses in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of insect physiology*, 57(6), 830-839.
53. Lizé, A., McKay, R., & Lewis, Z. (2013). Gut microbiota and kin recognition. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(6), 325–326.
54. Long, J. D., Hamilton, R. S., & Mitchell, J. L. (2007). Asymmetric competition via induced resistance: specialist herbivores indirectly suppress generalist preference and populations. *Ecology*, 88(5), 1232-1240.
55. Lotze, H. K., & Worm, B. (2000). Variable and complementary effects of herbivores on different life stages of bloom-forming macroalgae. *Marine Ecology Progress Series*, 200, 167-175.
56. Lubchenco, J. 1980. Algal zonation in New England rocky intertidal community: an experimental analysis. *Ecology* 61: 333–344.
57. MacArthur, R. (1955). Fluctuations of Animal Populations and a Measure of Community Stability. *Ecology*, 36(3), 533.
58. Macke, E., Tasiemski, A., Massol, F., Callens, M., & Decaestecker, E. (2017). Life history and eco-evolutionary dynamics in light of the gut microbiota. *Oikos*, 126(4), 508–531.
59. Martin M. (1994). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12. Retrieved from <https://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200/479>
60. Mcmurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq : An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. 8(4).
61. McQuaid, C. D. (1996). Biology of the gastropod family Littorinidae. II. Role in the ecology of intertidal and shallow marine ecosystems. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*.
62. Morris, E. J., & Van Gylswyk, N. O. (1980). Comparison of the action of rumen bacteria on cell walls from *eragrostis tef*. *The Journal of Agricultural Science*, 95(2), 313–323.
63. Moya, A., Peretó, J., Gil, R., & Latorre, A. (2008). Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218.
64. Nosil P. (2012) Ecological speciation. *Oxford University Press: Oxford, UK*. 304 p.
65. O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688-693.

66. Oliver, K. M., Moran, N. A., & Hunter, M. S. (2006). Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1591), 1273-1280.
67. Oxford, A. E. (1955). The rumen ciliate protozoa: their chemical composition, metabolism, requirements for maintenance and culture, and physiological significance for the host. *Experimental parasitology*, 4(6), 569-605.
68. Panova M, Blakeslee AM, Miller AW, Mäkinen T, Ruiz GM, Johannesson K, et al. (2011) Glacial history of the North Atlantic marine snail, *Littorina saxatilis*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages. *PLoS One*. 6(3): e17511
69. Panova M, Johansson T, Canbäck B, Bentzer J, Rosenblad MA, Johannesson K, et al. (2014) Species and gene divergence in *Littorina* snails detected by array comparative genomic hybridization. *BMC Genomics*. 15(1): 687.
70. Poinar, G. O. (2009). Description of an early Cretaceous termite (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution. *Parasites & Vectors*, 2(1), 12.
71. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, S., Manichanh, C., Yang, H. (2013). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Europe PMC Funders Author Manuscripts* 464(7285), 59–65.
72. Ravinet, M., Westram, A., Johannesson, K., Butlin, R., André, C., & Panova, M. (2016). Shared and nonshared genomic divergence in parallel ecotypes of *Littorina saxatilis* at a local scale. *Molecular ecology*, 25(1), 287-305.
73. Reid D.G. (1996). Systematics and Evolution of *Littorina*. *Ray Society, London*.
74. Reid, D. G., Dyal, P., & Williams, S. T. (2012). A global molecular phylogeny of 147 periwinkle species (Gastropoda, Littorininae). *Zoologica Scripta*, 41(2), 125-136.
75. Rolan-Alvarez, E., Austin, C., & Boulding, E. G. (2015). The contribution of the genus *Littorina* to the field of evolutionary ecology. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*, 53, 157-214.
76. Rolan-Alvarez, Emilio, Kerstin Johannesson, and Johan Erlandsson (1997) The Maintenance of a Cline in the Marine Snail *Littorina Saxatilis*: The Role of Home Site Advantage and Hybrid Fitness. *Evolution* 1838–47.
77. Schluter, D. (2009). Evidence for ecological speciation and its alternative. *Science*, 323(5915), 737-741.
78. Shannon, C. E., & Weaver, W. (1964). The Mathematical theory of communication. *The University of Illinois Press. Urbana*.

79. Shapira, M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*, 31(7), 539–549.
80. Sharon, G., Segal, D., Ringo, J. M., Hefetz, A., Zilber-Rosenberg, I., & E., R. (2010). Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 107(46), 20051–20056.
81. Sokolova, I. M. (1995). Embryonic abnormalities in populations of *Littorina saxatilis* (Olivi)(Gastropoda: Prosobranchia) in the White Sea. *Journal of molluscan studies*, 61(3), 303–311.
82. Sommer, F., & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota-masters of host development and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), 227–238.
83. Thong-On, A., Suzuki, K., Noda, S., Inoue, J., Kajiwarra, S., & Ohkuma, M. (2012). Isolation and Characterization of Anaerobic Bacteria for Symbiotic Recycling of Uric Acid Nitrogen in the Gut of Various Termites. *Microbes and Environments*, 27(2), 186–192.
84. Trussell, G. C., Ewanchuk, P. J., & Bertness, M. D. (2002). Field evidence of trait-mediated indirect interactions in a rocky intertidal food web. *Ecology Letters*, 5(2), 241–245.
85. Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., ... & Gaboriaud, C. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942.
86. Valles-Colomer, M., Falony, G., Darzi, Y., Tigchelaar, E. F., Wang, J., Tito, R. Y., ... Raes, J. (2019). The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nature Microbiology*, 4(4), 623–632.
87. Vettraino, A. M.; Morel, O.; Perlerou, C.; Robin, C.; Diamandis, S.; Vannini, A. (2005). "Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown decline". *European Journal of Plant Pathology*. 111 (2): 169–180.
88. Wang, Y., Tian, R. M., Gao, Z. M., Bougouffa, S., & Qian, P. (2014). Optimal Eukaryotic 18S and Universal 16S / 18S Ribosomal RNA Primers and Their Application in a Study of Symbiosis. 9(3).
89. Watson, D. C., & Norton, T. A. (1985). Dietary preferences of the common periwinkle, *Littorinalittorea* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 88(3), 193–211.

90. Watson, D. C., & Norton, T. A. (1987). The habitat and feeding preferences of *Littorina obtusata* (L.) and *L. mariae* Sacchi et Rastelli. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 112(1), 61-72.
91. Weiss, B., & Aksoy, S. (2011). Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends in Parasitology*, 27(11), 514–522.
92. Westram, A. M., Galindo, J., Alm Rosenblad, M., Grahame, J. W., Panova, M., & Butlin, R. K. (2014). Do the same genes underlie parallel phenotypic divergence in different *Littorina saxatilis* populations?. *Molecular ecology*, 23(18), 4603-4616.
93. Whittaker R.H. (1970) Communities and ecosystems. N.-Y.: London: Macmillan.,- 162 p
94. Williams, G. A. (1990). *Littorina mariae*—a factor structuring low shore communities?. *Hydrobiologia*, 193(1), 139-146.
95. Wilson, A. C., Ashton, P. D., Clevro, F., Charles, H., Colella, S., Febvay, G., ... & Thomas, G. H. (2010). Genomic insight into the amino acid relations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, with its symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola*. *Insect molecular biology*, 19, 249-258.
96. Гранович А. И. (2016) От систем паразит-хозяин к паразитарным системам. Взаимодействие моллюсков рода *Littorina* с паразитирующими в них трематодами. *Зоологический журнал*, 95(3): 252-266.
97. Гранович, А. И., Михайлова, Н. А., Знаменская, О. & Петрова, Ю. А. (2004). Видовой состав моллюсков рода *Littorina* (Gastropoda, Prosobranchia) Восточного Мурмана. *Зоологический журнал*, 83(11), 1305–1317.
98. Янковский А.В., (1973). Паразитические Ciliophora. *Паразитология*, vii, 3, 197 3. 214–219.
99. Яценко, В. В. & Гранович, А. И. (2002). *Littorina fabalis* (Turton, 1825): еще один вид литоральных гастропод Белого моря. *Вестник Санкт-Петербургского Университета. Серия 3: Биология*, 4(27), 34–45.

Приложения



Приложение 1. Встречаемость (Prevalence) доминантных OTU (>1% хотя бы в одной пробе) в кишечных образцах двух географических точек. Заливка – встречаемость таксономических единиц в пробах определенной категории, размер точки – медианное относительное обилие в процентах. OTU отсортированы по убыванию суммарной встречаемости.

Набор обнаруженных в кишечном материале организмов в целом достаточно стереотипен для всех видов моллюсков. Hildenbrandia и Eucariota_unclassified (BLAST-анализ отдельных прочтений показал, что вероятно, это организмы, близкие родам *Chromadorina* и *Eurystomina* (Nematoda), а также Halocafeteria (Heterocont)) обнаруживаются во всех биологических повторностях всех кишечных образцов, при этом их относительное обилие в большинстве случаев превышает 30%. Ulvophyceae и Intramacronucleata присутствуют в составе многих моллюсков и в Arsholmen, и в Ramsö. Для большинства образцов характерно содержание ДНК Dothideomycetes, Cladosporium, Oligohymenophorea и Phyllopharyngea, хотя встречаемость этих таксонов наиболее высока в кишечных пробах *L. saxatilis C*.



- 1 Зона валунов (Boulder shore)
крабовая форма *L. saxatilis* (C), *L. fabalis*, *L. littorea*
 - затишные бухты, заросшие фукоидами
 - пресс хищничества краба *Carcinus maenas*
- 2 Нижняя зона прибойных скал
 (Lower rocky shore)
нижняя скальная форма *L. saxatilis* (WL)
 - нижняя часть открытой скальной поверхности
 - влияние прибойных волн
- 3 Верхняя зона прибойных скал
 (Lower rocky shore)
верхняя скальная форма *L. saxatilis* (WH)
 - верхняя часть открытой скальной поверхности
 - влияние высокой засушливости

рисунок Сологуб Марии

Приложение 2. Схема расположения моллюсков рода *Littorina* в соответствии с занимаемыми биотопами.

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)
site	1	0.1973	0.01494	0.9945	0.41530
sp_bio	7	3.8616	0.29235	2.7809	1e-05 ***
site:sp_bio	7	2.4052	0.18209	1.7320	0.00461 **
Residual	34	6.7449	0.51063		
Total	49	13.2089	1.00000		

Приложение 3. Результаты пермутационного дисперсионного анализа на основе матриц расстояний. site – точка сбора, sp_bio – тип образца (для средовых образцов - биотоп, для образцов из кишечника - вида моллюска и биотоп), site:sp_bio - взаимодействие этих факторов. Df - число степеней свободы; SumOfSqs - изменчивость (сумма квадратов), связанная с каждым из факторов; R2 - коэффициент детерминации (доля изменчивости, объясненная каждым из факторов); F - значение псевдо-F статистики; Pr(>F) - уровень значимости p (** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$).